

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協定の条約に基づいて公開された国際出願

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) 国際特許分類6</b><br>C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 15/63,<br>5/10, 1/21, C12P 21/02, A61K 38/17,<br>G01N 33/68   | <b>A1</b> | <b>(11) 国際公開番号</b><br><b>WO99/55864</b><br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>1999年11月4日(04.11.99)  |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP99/02284<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1999年4月28日(28.04.99)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平10/119731      1998年4月28日(28.04.98) <b>JP</b><br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>小野薬品工業株式会社<br>(ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP)<br>〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号<br>Osaka, (JP)<br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</b><br>本庶 佑(HONJO, Tasuku)(JP/JP)<br>〒606-0001 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4 Kyoto, (JP)<br>田代 啓(TASHIRO, Kei)(JP/JP)<br>〒603-8162 京都府京都市北区小山東大野町93 Kyoto, (JP)<br>中邨智之(NAKAMURA, Tomoyuki)(JP/US)<br>カリフォルニア州サンディエゴ5324番<br>パルミラドライブ7665 California, (US)  |           | <b>(74) 代理人</b><br>弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihisa et al.)<br>〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号<br>堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)<br><br><b>(81) 指定国</b> JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE,<br>DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)<br><br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |
| <b>(54)Title: NOVEL POLYPEPTIDE, cDNA ENCODING THE SAME AND UTILIZATION THEREOF</b><br><br><b>(54)発明の名称</b> 新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびその用途<br><br><b>(57) Abstract</b><br>A novel human polypeptide. Because of having an effect of inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells, this polypeptide is applicable to the treatment of diseases in which abnormal smooth muscle proliferation participates, for example, arteriosclerosis and myoma. Moreover, this polypeptide has hematopoietic cell regulatory activity, tissue forming/repairing activity, activin/inhibin activity, chemotactic/chemokinetic activity, blood coagulating and thrombotic activity, receptor/ligand activity, etc. Thus, it seems useful in preventing and/or treating various diseases. |           |   |

ヒトの新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびその用途に関する。

本発明のポリペプチドは、血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有するため、異常な平滑筋の増殖に係る疾患、例えば動脈硬化や筋腫等の治療に応用可能である。また、造血細胞制御活性、組織生成／修復活性、アクチビン／インヒビン活性、走化性／化学運動性活性、凝血および血栓活性、受容体／リガンド活性等を有し、種々の疾患予防および／または治療に有用であると考えられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |         |    |                |    |            |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦     | DM | ドミニカ    | KZ | カザフスタン         | RU | ロシア        |
| AL | アルバニア        | EE | エストニア   | LC | セントルシア         | SD | スーダン       |
| AM | アルメニア        | ES | スペイン    | LI | リヒテンシュタイン      | SE | スウェーデン     |
| AT | オーストリア       | FI | フィンランド  | LK | スリ・ランカ         | SG | シンガポール     |
| AU | オーストラリア      | FR | フランス    | LR | リベリア           | SI | スロヴェニア     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GA | ガボン     | LS | レソト            | SK | スロヴァキア     |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国      | LT | リトアニア          | SL | シエラ・レオネ    |
| BB | バルバドス        | GD | グレナダ    | LU | ルクセンブルグ        | SN | セネガル       |
| BE | ベルギー         | GE | グルジア    | LV | ラトヴィア          | SZ | スワジランド     |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GH | ガーナ     | MA | モロッコ           | TD | チャード       |
| BG | ブルガリア        | GM | ガンビア    | MC | モナコ            | TG | トーゴ        |
| BJ | ベナン          | GN | ギニア     | MD | モルドヴァ          | TJ | タジキスタン     |
| BR | ブラジル         | GW | ギニア・ビサオ | MG | マダガスカル         | TZ | タンザニア      |
| BY | ベラルーシ        | GR | ギリシャ    | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM | トルクメニスタン   |
| CA | カナダ          | HR | クロアチア   |    | 共和国            | TR | トルコ        |
| CF | 中央アフリカ       | HU | ハンガリー   | ML | マリ             | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ          | ID | インドネシア  | MN | モンゴル           | UA | ウクライナ      |
| CH | スイス          | IE | アイルランド  | MR | モーリタニア         | UG | ウガンダ       |
| CI | コートジボアール     | IL | イスラエル   | MW | マラウイ           | US | 米国         |
| CM | カメルーン        | IN | インド     | MX | メキシコ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CN | 中国           | IS | アイスランド  | NE | ニジェール          | VN | ヴェトナム      |
| CR | コスタ・リカ       | IT | イタリア    | NL | オランダ           | YU | ユーゴスラビア    |
| CU | キューバ         | JP | 日本      | NO | ノルウェー          | ZA | 南アフリカ共和国   |
| CY | キプロス         | KE | ケニア     | NZ | ニュージーランド       | ZW | ジンバブエ      |
| CZ | チェッコ         | KG | キルギスタン  | PL | ポーランド          |    |            |
| DE | ドイツ          | KP | 北朝鮮     | PT | ポルトガル          |    |            |
| DK | デンマーク        | KR | 韓国      | RO | ルーマニア          |    |            |

## 明細書

新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードする cDNA、  
およびその用途

5

## 技術分野

本発明は、新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードする cDNA、  
およびその用途に関する。

10

## 背景技術

現代医学の研究では、心臓血管系の疾患は死を招く原因であるので、心臓  
血管領域は大きな関心を喚起する分野である。心臓血管領域の研究は、動脈  
内膜再形成および動脈リモデリングに関する重要な事実を明らかにしており、  
双方とも動脈硬化におけるプラーク形成並びに血管狭窄に寄与すると考えら  
15 れている。例えば、動脈硬化の動物モデルでの血管損傷を与える高コレステ  
ロール血症における細胞レベルでの過程には 3 つの事象がある。動脈壁の病  
変を形成する 3 要素は、a) 平滑筋細胞、マクロファージおよびリンパ球の  
増殖、b) 結合組織の形成、c) 新たに形成された結合組織マトリックスへ  
の脂肪およびコレステロールの蓄積、である。この 3 要素の関与に関しての  
20 正確な順位付けには議論を要するが、平滑筋細胞の異常な分化、脱分化、増  
殖が構造的に血管障害に寄与することは明らかである。更に、平滑筋細胞の  
異常な増殖が関与するもう一つの重要な組織学的過程は、経皮的冠動脈形成  
術後 (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty) の再狭窄である。

血管形成における平滑筋が構成する部分に係る分子を単離し、上記のよう  
25 な異常な平滑筋細胞の増殖を制御するために使用することを目的として、鋭  
意努力した。

従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードするcDNAを得ようとする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチドの単離精製を経て、遺伝子をクローニングするという方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられてきた。

しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、微量しか産生されなかったり、特別な生理的条件下でのみ発現する因子も多く、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

近年、cDNAの作製技術やシーケンス技術は急速に発展し、大量のcDNAのシーケンスを迅速に行うことができるようになった。そこでこれらの技術を利用して、様々な細胞や組織からcDNAライブラリーを作製し、ランダムにcDNAをクローニングして塩基配列を決定し、新規なポリペプチドをコードする遺伝子を単離する方法が発展している。この方法は、生化学的、遺伝学的な解析を一切必要とせずに遺伝子をクローニングし、その塩基配列の情報を得ることができるという特徴を有しているが、目的とする遺伝子の発見は偶発的要素が大きい。

#### 発明の開示

本発明者らは、平滑筋細胞の異常増殖に係る疾患の治療、診断、あるいは研究上有益な新規な因子（ポリペプチド）、特に分泌シグナルを有する分泌蛋白質および膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行なった。

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子（例えば、各種サイトカ

イン等)のような分泌蛋白質やそのレセプターのような膜蛋白質(以下、これらをまとめて分泌蛋白質等と呼ぶ。)の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。

- 5    その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドをコードする配列を有する cDNA を簡単に選別できる方法(シグナルシーケンストラップ(SST)法)を見出した(特開平 6-315380 号参照)。

- さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに効率よくかつ簡便にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法(酵母 SST 法)も開発された(米国特許第 5,536,637 号参照)。
- 10    た(米国特許第 5,536,637 号参照)。

- 本方法を用いて、マウス胎児心臓組織およびヒト腎臓組織が産生している新規な分泌蛋白質、およびそれをコードする cDNA を同定することに成功し、全長 cDNA をその情報を基にマウス胎児心臓組織およびヒト脳組織より見出し、更に該ポリペプチドが血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有
- 15    することを確認し、本発明を完成した。

- 本発明が提供する cDNA 配列は、マウス A55 クローンと命名され、マウス胎児心臓組織から作製した cDNA ライブラリーより、上記酵母 SST 法を使用して得た情報をもとに単離された。マウス A55 クローンは分泌蛋白質(ここではマウス A55 蛋白として表わされる)をコードする完全な c
- 20    DNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

- 本発明が提供する cDNA 配列は、ヒト A55 クローンと命名され、上記酵母 SST 法を使用してヒト腎臓組織より得た情報をもとに、ヒト脳組織から作製した cDNA ライブラリーより見出された。ヒト A55 クローンは、分泌蛋白質(ここではヒト A55 蛋白として表わされる)をコードする完全
- 25    な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して BLASTN

および FASTA により、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTX、BLASTP および FASTA により検索した結果、本発明のポリペプチドマウス並びにヒト A 5 5 およびそれらをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

また、本発明者らは、前記ポリペプチドが血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有することを確認した。そのため、該ポリペプチドは異常な平滑筋の増殖に係る疾患、例えば動脈硬化や経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫等の治療に有用であると考えられる。

10 本発明は、

（１）配列番号 1、4、6、9、11 または 14 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

（２）前記（１）に記載したポリペプチドをコードする cDNA、

15 （３）配列番号 2、5、7、10、12 または 15 で示される塩基配列からなる cDNA、

（４）配列番号 3、8 または 13 で示される塩基配列からなる cDNA、  
に関する。

#### 図面の簡単な説明

20 図 1 は、PDGF 刺激によるラット大動脈血管平滑筋細胞の増殖に対し、マウス A 5 5 蛋白が阻害する様子を表わす。

図 2 は、PDGF 刺激によるラット大動脈血管平滑筋細胞の増殖に対し、ヒト A 5 5 蛋白が阻害する様子を表わす。

25

#### 詳細な説明

本発明は、実質的に純粋な形である配列番号 1、4、6、9、11 または

1 4で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、その配列のフラグメントおよびそのホモログに関する。

本発明はさらにそれらのポリペプチドをコードするcDNAに関する。より具体的には、配列番号2、5、7、10、12または15で示される塩基  
5 配列からなるcDNA、および配列番号2、5、7、10、12または15で示される塩基配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントを有するcDNAに関する。ハイブリダイズするcDNAには、上記配列の相補配列も含まれる。ハイブリダイズは、ストリンジェントな条件で行なわれることが好ましい。

10 実質的に純粋な形である配列番号1、4、6、9、11または14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号1、4、6、9、11または14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを意味する。

15 配列番号1、4、6、9、11または14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後  
20 本発明のポリペプチドとして記載される。

さらに、配列番号1、4、6、9、11または14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味す  
25 る。

配列番号2、5、7、10、12または15で示される塩基配列からなる

- cDNAに選択的にハイブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなcDNAは、以後本発明のcDNAとして記載される。

配列番号2、5、7、10、12または15で示される塩基配列からなるcDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のcDNAに含まれる。

- さらに、本発明には、本発明のcDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記cDNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えばcDNAに対応するRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いることができる。

- さらに、本発明には、配列番号2、3、5、7、8、10、12、13または15で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームからなるcDNAを含む本発明のcDNAを複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられる。

- さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行なわれることが好ましい。

本発明の cDNA は、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンス RNA を製造することもできる。このようなアンチセンス RNA は、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

- 5      本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体も含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法も含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、  
10      ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

- （１）の本発明のポリペプチドとしては、配列番号 1、4、6、9、11  
15      または 14 で示されたアミノ酸配列からなるもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号 1 中、生物活性の発現に必須な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、および上記本発明のポリペプチドに他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

- 20      よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは 1～6 種類（例えば、Met は 1 種類、Leu は 6 種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく cDNA の塩基配列を変えることができる。

- （２）で特定される本発明の cDNA には、（１）の配列番号 1、4、6、  
25      9、11 または 14 で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向

上することがある。

(3) で特定される cDNA は、(2) で示される cDNA の一態様であり、天然型配列を表わす。

- (4) に示される cDNA は、(3) で特定される cDNA に天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。

配列番号 3、8 または 13 で示される塩基配列を有する cDNA の作製は、以下の方法に従って行なわれる。

はじめに酵母 SST 法 (米国特許第 5,536,637 号に記載) の概要について説明する。

- 10     サッカロミセス・セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母がショ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない (インベルターゼはラフィノースをショ糖とメリビオースに、ショ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。)。また数多くの既知の哺乳類のシグナルペプチドは酵母
- 15     のインベルターゼを分泌させうることが知られている。

これらの知見から、酵母のインベルターゼの分泌を可能にする新規のシグナルペプチドを哺乳類の cDNA ライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

- 翻訳開始点 ATG を削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子 SUC2
- 20     (GENBANK accession No.V01311) を酵母の発現ベクターに組み込んで酵母 SST 用ベクター pSUC2 を作製した。

- 発現ベクターには、AAH5 プラスミド (Gammerer, Methods in Enzymol. 101,192-201,1983) 由来の発現用プロモーター (ADH プロモーター) およびターミネーター (ADH ターミネーター) が組み込まれ、酵母複製起点としては 2  $\mu$  ori、酵母選択マーカーには TRP1、大腸菌複製起点としては ColE1 ori、大腸菌薬剤耐性マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子が
- 25

それぞれ組み込まれている。

そのSUC2遺伝子上流に哺乳類のcDNAを組み込んで、酵母SST cDNAライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。組み込まれた哺乳類cDNAがシグナルペプチドをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対しても分泌作用をもつと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。

よって出現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサートcDNAの塩基配列を決定することによって、新規シグナルペプチドの検索を迅速かつ容易にした。

酵母SST cDNAライブラリーの作製は

- (1) 対象となる細胞よりmRNAを単離し、特定の制限酵素（酵素I）サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成し、
- (2) 酵素Iとは異なる特定の制限酵素（酵素II）サイトを含むアダプターを連結して、酵素Iで消化した後、適当なサイズで分画し、
- (3) 酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインベルターゼ遺伝子上流に得られたcDNA断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

各工程を詳しく説明すると、工程（1）では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法（以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) または Current Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubel ら編、John Wiley & Sons, Inc.より発刊) に記載の方法に従って行なわれる。）に従ってmRNAの単離が行なわれる。

対象となる組織としては、マウス胎児心臓が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖cDNAの合成は公知の方法により行なわれる。

アダプターに連結される制限酵素（酵素 I）サイトと次の工程（2）で用いられる制限酵素（酵素 II）サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素 I として X h o I、酵素 II としては E c o R I が用いられる。

- 5 工程（2）では T 4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素 II アダプターを連結した後、酵素 I で消化し、アガロース電気泳動（A G E）により 3 0 0 ～ 8 0 0 b p の c D N A を分画する。酵素 II は、前記したように酵素 I と異なるものなら何でもよい。

- 10 工程（3）は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプチドを削除したインベルターゼの遺伝子上流に（2）で得られた c D N A 断片を組み込んで大腸菌に形質転換する工程である。ここで酵母発現用プラスミドベクターとしては種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内でも機能する Y E p 2 4 などが用いられるが、好適には前述したプラスミド p S U C 2 が用いられる。

- 15 形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ましくは D H 1 0 B のコンピテントセルである。また形質転換方法は公知の方法のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により行なわれる。形質転換体は公知の方法により培養され、酵母 S S T 用の c D N A ライブラリーが得られる。

- 20 この c D N A ライブラリーでは、すべてのクローンに c D N A 断片が導入されている訳ではないし、またすべてが未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。

- そのためには、c D N A ライブラリーをインベルターゼ遺伝子をもたない  
25 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（例えば Y T 4 5 5 株など）またはインベルターゼ遺伝子的人為的に欠損させた株（公知の方法に従い作製可能）に、該 c D

NAライブラリーを導入し、シグナルペプチドをコードする配列を有する断片のスクリーニングを行なう。

酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行なわれる。

形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、

- 5 生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知の蛋白質

をコードすることが明らかになった cDNA については、それをプローブと

- 10 して全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行なわれる。

配列番号 2、5、7、10、12 または 15 で示される塩基配列が、一部、

好ましくは全てが確定されると哺乳類に存在する本発明の蛋白質をコードす

る cDNA もしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードす

- 15    るcDNAを得ることができる。

適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳

乳類由来のcDNAライブラリーあるいはmRNAからPCR法により、あ

るいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることに

より、他の哺乳類cDNAライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、

- 20 他の哺乳類型の当該蛋白質をコードする cDNA を得ることができる。

このようにして得られた cDNA が、SST で得られた cDNA 断片の塩

基配列（またはその相同配列）を含んでいるならばシグナルペプチドをコー

ドしていることになるので、該 cDNA が全長、またはほぼ全長であること

は明らかである（シグナルペプチドは例外なく蛋白質の N 末端に存在するこ

- 25    とから、cDNAのオープンリーディングフレームの5'末端にコードされ  
      ている。))。

さらに公知の方法に従い、該 cDNA をプローブとしてノザン (Northern) 解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られる mRNA のサイズと該 cDNA のサイズを比較し、ほぼ同じであれば該 cDNA はほぼ全長であると考えられる。

- 5      本発明は、開示された蛋白の全長型並びに成熟型の両方を提供する。それらの蛋白の全長型は、配列番号 2、7 または 12 で示される塩基配列の翻訳されるアミノ酸配列で同定される。それらの成熟蛋白は、配列番号 3、8 または 13 で示される全長 DNA を適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で発現させることによって得られる。成熟型の蛋白の配列は、全長型の
- 10    アミノ酸配列より予測可能である。

配列番号 2、5、7、10、12 または 15 で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の cDNA を得ることができる。

- 15    さらに、本 cDNA を含有するベクター cDNA を適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とする cDNA を必要量得ることができる。

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1)    生体または培養細胞から精製単離する方法、
- 20    (2)    ペプチド合成する方法、または
- (3)    遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的には (3) に記載した方法が好ましい。

- 遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系 (宿主-ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。
- 25    細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードする cDN

Aの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、  
10 ペリプラスム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号2、5、7、10、12または15で示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、分泌蛋白である本発明の蛋白は、その細胞上清中に目的とするポリペプチドとして発現される。さらに、その他のポリペプチド、例えば抗体の定常領域(Fc portion)をコードするcDNA断片と連結することによって、フュージョン・プロテイン(fusion protein)  
20 を生産することもできる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドおよびそれをコードする cDNA は、一つあるいはそれ以上の効果あるいは生物活性（以下に列挙するアッセイに関連するものを含む）を示すことが考えられる。

本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードする cDNA の投与あるいは使用（例えば、遺伝子療法や cDNA 導入に適したベクター）により、提供される。また、本発明者らは、本発明のポリペプチドが血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有することを確認した。そのため、本発明のポリペプチドを用いて平滑筋の異常な増殖が関係する疾患、例えば動脈硬化や経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫等の治療に応用可能であると考えられる。

本発明はこれに限定されるものではないが、以下の活性を示す可能性がある。

#### [サイトカイン活性および細胞増殖／分化活性]

本発明の蛋白は、サイトカイン活性および細胞増殖（誘導あるいは阻害）／分化活性（誘導あるいは阻害）を示す可能性、あるいはある細胞集団に他のサイトカインの産生を誘導あるいは抑制すると考えられる。

全ての既知のサイトカインを含む、現在発見されている多くの蛋白性因子は、因子に依存した一つあるいはそれ以上の細胞増殖アッセイ法で、活性を示してきたので、それらのアッセイは、サイトカイン活性の便利な確認法として機能する。本発明の蛋白の活性は、多くの従来の因子依存性の細胞株の細胞増殖アッセイのうちのいずれかによって証明され得る。

#### [免疫刺激／抑制活性]

本発明の蛋白は、免疫刺激活性および免疫抑制活性も示すと考えられる。

また、ある蛋白は、例えば、T リンパ球および B リンパ球あるいはどちらか一方の成長および増殖を制御（刺激あるいは抑制）することや、同様にNK細胞や他の集団の細胞傷害性活性に影響を与えることによって、様々な免疫不全および疾患（severe combined immunodeficiency（SCID）を含む）の治療に効果を示すと考えられる。

これらの免疫不全は遺伝性である場合もあるし、例えばHIVのようなウイルスや、同様に細菌やカビの感染が原因で起こる場合もある。あるいは、自己免疫疾患に由来する可能性もある。

より具体的には、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、肝炎ウイルス（hepatitis viruses）、ヘルペスウイルス（herpes viruses）、ミコバクテリア（mycobacteria）、リーシュマニア（leishmania）、マラリア（malaria）およびカンジダ（candida）のような様々なカビ感染を含む、ウイルス、細菌、カビあるいは他の感染による感染症の原因を、本発明の蛋白を用いることによって治療できると考えられる。もちろん、この関連より、本発明の蛋白は、免疫システムが増大していることが一般的に示唆される場所、すなわち癌治療の箇所において効果を示すと考えられる。

本発明の蛋白は、アレルギー反応および喘息や他の呼吸器系疾患のような状況の治療に効果にも効果を示すと考えられる。免疫抑制が望まれるような他の状態（例えば、喘息や関連呼吸器疾患を含む）にも、本発明の蛋白を用いて治療できると考えられる。

本発明の蛋白は、例えば、敗血病性のショックあるいは全身性炎症反応症候群（SIRS）のような感染、炎症性大腸炎、クローン病、あるいはIL-11により効果が証明されたTNFやIL-1のようなサイトカインの過剰産生から由来するような感染に関連した慢性あるいは急性の炎症を抑制する可能性もある。

[造血細胞制御活性]

本発明の蛋白は、造血細胞の制御に、またそれに応じて骨髓球様細胞あるいはリンパ球様細胞の欠乏に対する治療にも効果を示すと考えられる。コロニー形成細胞あるいは因子依存性細胞株の援助の下での極く弱い生物活性でさえも、造血細胞の制御に係わることを示唆する。その生物活性とは、次に

5 挙げる例の全てあるいはそのいずれかで例えられるようなものに係わるものである。赤血球前駆細胞のみの成長および増殖を支持、あるいは他のサイトカインとの組み合わせ、また、それが示唆する有効性、例えば様々な貧血の治療、あるいは赤血球前駆細胞および赤血球あるいはそのどちらかの産生を刺激する放射線療法／化学療法と組み合わせての使用；

- 10 顆粒球および単球／マクロファージのような骨髓球の成長および増殖を支持（すなわち、古典的なCSF活性）、化学療法に伴う骨髓抑制を防ぐための化学療法との併用；

巨核球の成長および増殖およびそれに続く血小板の成長および増殖の支持、それによって血小板減少症のような様々な血小板障害を防御および治療を可

- 15 能とする血小板輸血の際あるいは相補的に一般的使用；

上記造血細胞の幾つかあるいは全ての細胞へ成熟可能な造血幹細胞の成長および増殖の支持、従って、様々な幹細胞障害（限定はされないが、再生不良性貧血および発作性夜間血色素尿症を含む、移植で一般的に治療されるようなもの）に治療的効果を見い出せる、また、正常細胞あるいは遺伝子療法の

- 20 ため遺伝的に操作された細胞をインビトロ（in-vitro）あるいはエクソビボ（ex-vivo）（すなわち、骨髓移植に伴う）どちらかで、放射線療法／化学療法後の幹細胞分画の再構築を行なうことも同様である。

種々の造血幹細胞株の増殖と分化に対する適切なアッセイは、上記に記載されている。

- 25 本発明の蛋白は、他の方法の中で、以下の方法により測定することが可能である。

## [組織生成／修復活性]

本発明の蛋白は、損傷治癒および組織修復、また、火傷、切開、および潰瘍の治療と同様に、骨、軟骨、腱、靱帯、および神経組織成長あるいは再生のいずれかに使用されることが考えられる。

- 5 骨を正常に形成しない環境での軟骨および骨あるいはいずれかの成長を誘導するような本発明の蛋白は、ヒトおよび他の動物の骨折および軟骨損傷あるいは欠損の治療に適用される。本発明の蛋白を使用している製剤は、開放骨折と同様に閉鎖骨折の整復、また人工関節の固定の改良にも、予防的使用できると考えられる。
- 10 骨形成剤により誘導された新生骨形成は、先天性、外傷性、癌切除術により誘発した頭蓋顔面の欠損の修復に貢献する。また、美容形成外科分野にも有効である。

- 本発明の蛋白は、歯根膜症の治療および他の歯の修復にも使用されることが考えられる。そのような薬品は、骨形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。
- 15

本発明の蛋白は、骨および軟骨あるいはいずれかの修復を刺激することを通して、あるいは、炎症あるいは炎症過程で介される組織破壊（コラゲナーゼ活性や破骨細胞の活性）の過程を阻止することにより、骨粗鬆症および骨関節炎の治療に有効であると考えられる。

- 20 本発明の蛋白に起因すると考えられる組織再生活性の別のカテゴリーは腱／靱帯形成である。本発明の蛋白は、腱／靱帯様組織あるいは他の組織が正常に形成されない環境でそのような組織形成を誘導するものであるが、ヒトおよび他の動物における腱／靱帯の裂傷、奇形、および他の腱／靱帯の障害の治療に適用できる。
- 25 腱／靱帯様組織を誘導する蛋白を使用している製剤は、骨あるいは他の組織への腱／靱帯の固定の改良、および腱／靱帯組織の欠損の修復での使用は

もちろん、腱あるいは靱帯の損傷の防御に対して予防的使用も考えられる。

本発明の構成物により誘導された新生腱／靱帯様組織形成は、先天性、外傷、あるいは他の起源の腱あるいは靱帯欠損の修復に貢献する。また、腱あるいは靱帯の貼付あるいは修復という美容形成外科でも有効である。

- 5      本発明の構成物は、腱／靱帯形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。あるいは、組織修復を果たすため、インビボ (in vivo) への返還に備えて エクソビボ (ex vivo) で腱／靱帯細胞あるいはその前駆細胞を誘導する。

- 10      本発明の構成物は、腱炎、カーパルタネルシンドローム (Carpal tunnel syndrome)、および他の腱あるいは靱帯欠損の治療にも有効である。該構成物には、適当なマトリックスおよびキャリアーと同様に当業者に良く知られているセクエスティング (Sequestering) 剤も含まれる。

- 15      本発明の蛋白は、神経細胞の増殖、および、神経および脳組織の再生、即ち、神経細胞あるいは神経組織の変性、死、あるいは外傷を含む機械的および外傷的障害と同様に中枢および末梢神経系疾患および神経病の治療に対しても、効果を示すと考えられる。

- 20      より具体的には、ある蛋白は、末梢神経障害、末梢神経症、および局所的神経症のような末梢神経系の疾患、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイードラガー (Shy-Drager) 症候群のような中枢神経系の疾患の治療に有効であると考えられる。

更に本発明に応じて治療され得る条件には、脊髄障害、頭部外傷、および脳卒中等の脳血管疾患のような機械的および外傷的障害を含む。化学療法あるいは他の治療から起因する末梢神経症も本発明の蛋白を用いて治療可能である。

- 25      本発明の蛋白は、例えば脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む臓器、平滑、骨格あるいは心臓筋肉、および血管内皮を含む血管組織のような他の

組織を生成する活性、あるいはそのような組織を構成する細胞の増殖を促進または抑制する活性を示す可能性も期待される。望まれる効果の一部は、正常組織を再生させる繊維性瘢痕の阻害によっても担われると考えられる。

- 5 本発明の蛋白は、消化管保護あるいは再生、および肺あるいは肝臓の繊維化、様々な組織の再還流損傷、および全身性サイトカイン障害に起因する状態に対する治療にも有効であると考えられる。

[アクチビン／インヒビン活性]

- 10 本発明の蛋白は、アクチビン／インヒビンに関連した活性を示すと考えられる。アクチビンは濾胞刺激ホルモン（F S H）の放出を刺激する活性によって特徴づけられるが、インヒビンは、濾胞刺激ホルモン（F S H）の放出を阻害する活性によって特徴づけられる。よって、本発明の蛋白は、単独あるいはインヒビン $\alpha$ ファミリーのメンバーとのヘテロダイマーで、哺乳類動物の雌の受精率を減少させ、雄の精子形成を減少させるインヒビンの活性に基づく避妊調節剤として有効であると考えられる。充分量の他のインヒビン  
15 の投与によって、哺乳動物の不妊を誘導可能である。

- 一方、本発明の蛋白は、インヒビン $\beta$ グループの他の蛋白サブユニットとのホモダイマーあるいはヘテロダイマーで、前脳下垂体の細胞から濾胞刺激ホルモン（F S H）放出を刺激するアクチビン分子の活性に基づいた治療的な不妊誘導として有効であると考えられる（米国特許第 4,798,885 号を参照）。  
20 本発明の蛋白は、牛、羊、および豚のような家畜の生涯出産能力可能な期間を延ばすために、性的に未熟なほ乳類動物における妊娠開始を早めることに有効であると考えられる。

[走化性／化学運動性活性]

- 25 本発明の蛋白は、例えば、単球、好中球、T 細胞、マスト細胞、好酸球、および内皮細胞、あるいはそのいずれかを含む、哺乳動物の細胞に対して（例えば、ケモカインとして働く）走化性／化学運動性活性を有すると考えられ

る。

- 走化性／化学運動性蛋白は、反応の望まれる部位へ、望まれる細胞集団を固定化あるいは引き寄せるため使用することが可能である。走化性／化学運動性蛋白は、局所的な感染と同様に、創傷および他の外傷の治療に特別な優
- 5 位性を提供する。例えば、リンパ球、単球、あるいは好中球を腫瘍あるいは感染部位へ引き寄せることは、腫瘍あるいは感染部位に対する免疫応答を改善する結果となると考えられる。

- 蛋白やペプチドは、もしそれが直接あるいは間接に特殊な細胞集団に対して指示された方向あるいは運動を刺激可能であれば、そのような細胞集団に
- 10 対する走化性活性を保持している。望ましくは、その蛋白やペプチドは、細胞の指示された運動を直接的に刺激する活性を保持する。

特別な蛋白がある集団の細胞に対し走化性活性を保持するか否かは、どんな既知の細胞走化性のアッセイ法にそのような蛋白あるいはペプチドを使用しても容易に決定できる。

#### 15 [凝血および血栓活性]

- 本発明の蛋白は、凝血あるいは血栓活性も示すと考えられる。結果として、そのような蛋白は、様々な凝固障害（血友病のような遺伝性障害を含む）の治療に有効であると予期される。あるいは、外傷、手術あるいは他の原因により生じた創傷の治療における凝固および他の凝血事象を促進させることが
- 20 予期される。本発明の蛋白は、血栓の形成の溶解あるいは阻害、および血栓あるいは卒中等により生じる状態の治療および予防にも効果があると考えられる。

#### [受容体／リガンド活性]

- 本発明の蛋白は、受容体、受容体／リガンドあるいは受容体／リガンドの
- 25 インヒビターあるいはアゴニストとしての活性を示す可能性もある。そのような受容体およびリガンドの例として、サイトカイン受容体およびそのリガ

ンド、受容体キナーゼおよびそのリガンド、受容体フォスファターゼおよびそのリガンド、細胞間相互作用に関連した受容体（セレクトイン（Selectin）、インテグリン（Integrin）、およびそのリガンド、受容体キナーゼを含む細胞接着分子等）およびそのリガンド、および抗原提示、抗原認識、および細胞性および液性免疫反応の発達に係わる受容体／リガンドの組み合わせが挙げられるが、本発明を制限するものではない。

受容体およびリガンドは、その相互作用に対する可能なペプチドあるいは小分子のインヒビターのスクリーニングにも有効である。本発明の蛋白（受容体およびリガンドの断片を含むが、制限されるものではない）は、それ自身受容体／リガンドの相互作用のインヒビターとして有効であると考えられる。

#### 〔栄養剤としての利用〕

本発明の蛋白は栄養源または栄養補給剤としても使用できる。このような使用には、制限はされないが、蛋白、アミノ酸の補給、炭素源、窒素源としての使用、炭水化物源としての使用が含まれる。そのような場合において、本発明の蛋白は各生物の食物に添加できるし、また粉末や錠剤、溶液、懸濁液、カプセルなどの剤型のように、分離した個体または液体の状態で服用できる。微生物の場合、本発明の蛋白を培養液中に添加することもできる。

#### 〔カドヘリン／腫瘍転移抑制活性〕

カドヘリンはカルシウム依存性接着分子であり、個体発生において特に特異的に細胞種を認識する際に主要な役割を果たすことが明らかとなっている。通常のカドヘリンの発現の欠失または変化により、腫瘍の増殖または転移につながる細胞接着性の変化が起こりうる。カドヘリンの機能不全はまた尋常性天疱瘡や落葉性天疱瘡（自己免疫発斑皮膚病）、クローン病、いくつかの発生異常のようなヒトの別の疾病にも関連している。

カドヘリンスーパーファミリーのメンバーは40を越え、個々に異なる発

現パターンを示す。カドヘリンスーパーファミリーのすべてのメンバーは共通の保存された細胞外リピート（カドヘリンドメイン）を有するが、分子の別の部位においては構造上の差異が認められる。

- カドヘリンドメインはカルシウムと結合しカドヘリン間で4次構造を形成するのでカルシウムは接着に必須である。最初のカドヘリンドメインの数個の5 アミノ酸のみがホモフィリックな接着に必須である。

- この認識部位の修飾によりカドヘリンの特異性を変えることが可能であるので、変異分子はそれ自身だけを認識するのではなく、異なるカドヘリンとも結合可能となる。またいくつかのカドヘリンは異なるカドヘリンとヘテロ10 フィリックな接着をする。

- E-カドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーのメンバーのひとつで上皮細胞系で発現している。もしE-カドヘリンの発現が腫瘍でみられない場合、病理学的には悪性細胞が浸潤し、癌が転移する。癌細胞株にE-カドヘリンの遺伝子をトランスフェクトした場合、細胞の形が通常に戻り、細胞間15 や基質への接着性が保たれ、細胞増殖速度が遅くなり、足場非依存的な細胞増殖が劇的に減少することにより、癌にともなう変化が元に戻る。このように導入したE-カドヘリンの発現により癌の進行が低いステージに戻る。また別のカドヘリンは別の組織由来の癌において同じ浸潤抑制の機能をもつと考えられる。そこでカドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする20 本発明の遺伝子は癌の治療に用いることができる。このような蛋白または遺伝子を癌細胞に導入することは、通常のカドヘリンの発現を供給することにより、癌細胞においてみられる変化を減少または排除することができる。

- 癌細胞はまた異なる組織のカドヘリンの発現を示すことがある。その結果このような細胞は体内の異なる組織に浸潤、転移することができるようになる。25 このような細胞において、カドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする本発明の遺伝子は異所発現したカドヘリンに置換されうる。そ

の結果、通常の細胞の接着性を保ち、転移性を減少または排除する。

またカドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする本発明の遺伝子はカドヘリンを認識し結合する抗体の産生に利用できる。このような抗体は癌細胞に異所発現したカドヘリンの結合をブロックすることに使用でき、  
5 癌の形成を妨げる。このような抗カドヘリン抗体はまた癌のグレード、病理学的タイプ、予後に対するマーカーとして使用できる。すなわち、より癌が進行していればカドヘリンの発現はより低いであろうし、カドヘリン発現の減少はカドヘリンに結合する抗体を用いることにより検出することができる。

またカドヘリン活性を有する本発明の蛋白の断片、好ましくはカドヘリン  
10 認識部位の10個のペプチド、およびこのような本発明の蛋白断片をコードする遺伝子はカドヘリンと結合し、好ましくない効果をもたらすカドヘリンの結合を妨げることにより、カドヘリンの機能をブロックすることにも使用できる。さらにカドヘリン活性を有する本発明の蛋白の断片、好ましくは癌患者で安定して循環しているトランケートした可溶化カドヘリン断片、およ  
15 びそのような本発明の蛋白断片をコードする遺伝子は固有の細胞間の接着を阻害することに使用できる。

#### [腫瘍抑制活性]

上記の免疫学的処置または腫瘍の予防の活性に加えて、本発明の蛋白は別の抗腫瘍活性を示す可能性がある。蛋白は直接的に、または例えばADCC  
20 を通してのような間接的に腫瘍の増殖を阻害すると考えられる。また蛋白は、腫瘍組織または腫瘍前駆組織に作用することにより、腫瘍の増殖を支持するために必要な組織の形成を阻害する（例えば血管新生を阻害する）ことにより、腫瘍の増殖を阻害する別の因子、活性物質または細胞種を産生することにより、腫瘍の増殖を促進する因子、活性物質または細胞種を除去または阻  
25 害することにより腫瘍阻害活性を示す可能性がある。

#### [その他の活性]

本発明の蛋白（ポリペプチド）は、以下に示す付加的な活性あるいは効果の一つあるいはそれ以上を示すと考えられる：細菌、ウィルス、カビ、および他の寄生虫を含む感染性の物質を殺傷する；

- 身長、体重、髪の色、目の色、肌あるいは他の組織の色素沈着、あるいは器官の大きさ（例えば胸部増量あるいは減量）等、身体的特徴を抑制あるいは促進する効果を及ぼす；

食餌脂肪、蛋白、あるいは炭水化物の分解に効果を示す；

食欲、性欲、ストレス、認識（認識障害）、鬱病、暴力行動を含む行動特徴に効果を及ぼす；

- 10 鎮痛効果あるいは他の痛みを減少させる効果を提供する；

胚性幹細胞の造血系以外の他の系統への分化および増殖を促進する；

および、酵素の場合、その酵素の欠失を補い、また関連疾患を治療する。

上記活性を有する蛋白は、例えば、B細胞、T細胞、肥満細胞の増殖または細胞死、免疫グロブリンのクラススイッチ促進によるクラス特異的誘導、

- 15 B細胞の抗体産生細胞への分化、顆粒球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、単球・マクロファージ前駆細胞の増殖または分化、細胞死、好中球、単球・マクロファージ、好酸球、好塩基球の増殖または機能亢進、細胞死、巨核球前駆細胞の増殖または細胞死、好中球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、BまたはT前駆細胞の増殖または分化、細胞死、赤血球の産生促進、赤血球、

- 20 好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、肥満細胞、巨核球前駆細胞の増殖支持、好中球、単球・マクロファージ、B細胞またはT細胞の遊走促進、胸腺細胞の増殖または細胞死、脂肪細胞の分化抑制、ナチュラルキラー細胞の増殖または細胞死、造血幹細胞の増殖または細胞死、幹細胞および各種造血前駆細胞の増殖抑制、間葉系幹細胞からの骨芽細胞、軟骨細胞への分化促進または増殖、細胞死、あるいは破骨細胞の活性化や単球から破骨細胞への分化促進による骨吸収の促進の作用を本発明のポリペプチドのみで、
- 25

またリガンドーレセプター間の結合を介して、あるいは他の分子と相乗的に働くことにより有すると考えられる。

また本発明のペプチドは神経系にも作用することが予測されるので、各種神経伝達物質作動性神経細胞への分化ならびにそれらの生存維持または細胞死、グリア細胞の増殖促進または細胞死、神経突起の伸展、神経節細胞の生存維持または細胞死、アストロサイトの増殖または分化促進または細胞死、末梢神経の増殖または生存維持、細胞死、シュワン細胞の増殖または細胞死、運動神経の増殖または生存維持、細胞死の作用もあると考えられる。

さらに、本発明のポリペプチドは初期胚の発生過程において、外胚葉誘導作用による表皮、脳、背骨、神経の器官形成、中胚葉誘導作用による背索結合組織（骨、筋肉、腱）、血球細胞、心臓、腎臓、生殖巣の器官形成、あるいは内胚葉誘導作用による消化器系臓器（胃、腸、肝臓、膵臓）、呼吸器系（肺、気管）の形成に促進的または抑制的に作用すると考えられ、成体においても上記器官の増殖あるいは増殖抑制作用を有すると考えられる。

したがって、本発明のポリペプチドはそれ自身で、免疫系または神経系もしくは骨代謝の機能の低下または亢進に関する疾患、または造血系細胞の発育不全または異常増殖、例えば、炎症性疾患（リウマチ、潰瘍性大腸炎等）、骨髓移植後の造血幹細胞の減少症、ガン、白血病に対する放射線照射または化学療法剤投与後の白血球、血小板、B細胞またはT細胞の減少症、貧血、感染症、ガン、白血病、エイズ（AIDS）、骨代謝異常（骨粗鬆症等）、動脈硬化、各種変性疾患（アルツハイマー病、多発性硬化症等）、あるいは神経損傷の予防または治療薬として用いることが期待される。

また本発明のポリペプチドは、外胚葉、中胚葉または内胚葉由来器官の分化、増殖作用を有すると考えられるので、各器官（表皮、骨、筋肉、腱、心臓、腎臓、胃、腸、肝臓、膵臓、肺、気管等）の組織修復剤として用いることも期待される。

また、本発明のポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行なえ、これによって本発明のポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は本発明の  
5 ポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて公知の方法により作製することができる。

また本発明のポリペプチドを用いることにより、例えばアフィニティークラムを作製して、本発明のポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白(リガンド)の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行なうことができ  
10 る。

また本発明のポリペプチドを用いて、例えばウエスト-ウエスタン法により、または本発明のcDNA(好ましくは本発明のポリペプチドをコードするcDNAを用いて、例えば酵母2-ハイブリッド法により本発明のポリペプチドと相互作用する分子の同定、遺伝子クローニングを行なうこともでき  
15 る。

さらに本発明のポリペプチドを用いることによって、本発明のポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニングは、例えば、以下の方法により行なうことが出来る。すな  
20 わち、

a) 本発明のポリペプチド、スクリーニングすべき化合物、および細胞を含む反応混合物を、細胞が本発明のペプチドにより正常に刺激される条件下一緒にし(該反応混合物は細胞が増殖するに従い細胞中に導入される標識および本発明のペプチドの機能を効果的に観察させるための本発明のペプチド  
25 以外のペプチドを含む) ; ついで

b) 細胞の増殖の程度を測定して、対象化合物が有効なアンタゴニストまた

はアゴニストであるかどうかを決定する。

より詳細には、以下のようにして行なわれる。すなわち：

ラット血管平滑筋細胞株（ATCC CRL-1444 または CRL-1476）をプレートにまいて、10%血清存在下で24時間培養した後、望ましくは1, 10または50 ng/ml 濃度のヒトPDGF-BB（GENZYME 社製）を含む無血清培地に交換する。A55蛋白のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする場合は、その際A55蛋白とスクリーニングすべき化合物を同時に添加した後、24時間培養後に<sup>3</sup>H-チミジンを添加し、その4時間培養後に細胞に取りこまれた<sup>3</sup>Hを測定することによって、A55蛋白の<sup>3</sup>H-チミジン取り込抑制活性を阻害する化合物をスクリーニングができる。A55蛋白のアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする場合は、上記細胞にスクリーニングすべき化合物を添加した後、24時間培養後に<sup>3</sup>H-チミジンを添加し、その4時間培養後に細胞に取りこまれた<sup>3</sup>Hを測定することによって、<sup>3</sup>H-チミジン取り込抑制活性を有する化合物をスクリーニング

5  
10  
15

ができる。

本発明のcDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA（RNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。

また、本発明のcDNAをプローブとしてジェノミック（genomic）DNAを分離できる。同様にして、本発明cDNAと相同性の高いマウスあるいはヒトの関連ポリペプチドの遺伝子、またマウスあるいはヒト以外の生物における本発明ポリペプチドと相同性の高いポリペプチドの遺伝子を分離することも可能である。

20

## 25 [医薬品への適用]

前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明の

ポリペプチドに対する抗体は通常、全身的又は局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、 $100\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ の範囲で、一日一回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、一回につき、 $10\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ の範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、安定化剤（ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（アルギニン、アスパラギン酸等）を含有していてもよい。

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセル

ロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

5 経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤（例えば、精製水、エタノール等）を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

10 経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第 2,868,691 号および同第 3,095,355 号明細書に詳しく記  
15 載されている。

本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（登録商標）等が挙げられる。  
20

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。  
25

## 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明のA55クローンに関する実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

### 5 実施例1：poly (A)<sup>+</sup>RNAの調製

マウス18.5日胎児心臓組織よりTRIzol試薬 (TRIzol reagent, 登録商標、GIBCOBRLより購入) を用いて全RNAを抽出し、mRNAプリフィケーション・キット (mRNA Purification Kit, 商品名、Pharmaciaより購入) を用いてpoly (A)<sup>+</sup>RNAを精製した。

10

### 実施例2：酵母SST cDNAライブラリーの作製

上記のpoly (A)<sup>+</sup>RNAを鋳型にXhoI部位を連結したランダム9mer：5' -CGATTGAATTCTAGACCTGCCTCGAGNNNNNNNNN-3' (配列番号16) をプライマーとして、スーパー

15 スクリプト・プラスミド・システム (SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning, 商品名、GIBCOBRLより購入) を用いて2本鎖cDNAの合成を行なった。EcoRIアダプター (GIBCOBRLより購入) をDNAライゲーションキット (DNA ligation kit ver.2, 商品名、宝酒造(株)より購入。以下cDNAの連結はすべて本キットを使用した。) を用いて連

20 結した後、XhoIで消化し、アガロース電気泳動で300～800bpのcDNAを切り出して分画し、pSUC2 (米国特許5,536,637号参照) のEcoRI/NotI部位に連結し、大腸菌DH10B株にエレクトロポレーション法で形質転換して酵母SST用のcDNAライブラリーを得た。

### 25 実施例3：SSTによるスクリーニングおよびSST陽性クローンの塩基配列の決定

このcDNAライブラリーのプラスミドを調製し、酢酸リチウム法 (Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1 を参照) により酵母 YTK 12 株を形質転換し、トリプトファン (T r p) 不含の酵母形質転換体の選択培地 (CMD-T r p 培地) のプレート上にまいた。30℃で48時間インキュベートした後、アキュトラン・レプリカ・プレーター (Accutran Replica Plater, 商品名、Schleicher & Schuell より購入) を用いて得られたコロニー (形質転換体) のレプリカをラフィノースを炭素源とする YPR プレートにとり、30℃で14日間インキュベートした。3日目以降、出現してきた各々のコロニーを一つずつ再度 YPR プレートにストリークして30℃で48時間インキュベートした後、シングルコロニーをYPD培地に植菌し、30℃で48時間インキュベートした後、プラスミドを調製した。続いてpSUC2のクローニングサイトの両端の配列の2種類のプライマー (センス鎖はビオチン化プライマー) を用いて公知の方法に従ってPCRを行ない、インサートcDNAを増幅した後、ダイナビーズ (Dynabeads, 商品名、DYNAL より購入) を用いて

5  
10  
15

ビオチン化1本鎖cDNAを精製し、塩基配列の決定を行なった。

塩基配列の決定はDNAシーケンシング・キット (DNA Sequencing kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction), 商品名、Applied Biosystems Inc. より購入) を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシーケンス法で反応を行ない、自動DNAシーケンサー373 (Applied Biosystems Inc.) で読み取りを行なった (以下、塩基配列決定はすべて 本方法で行なった。 ) 。

20

得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてデータベースとの相同性検索を行ない、A55と名付けられたクローンがデータベースに登録されていない新規のcDNAであることが明らかとなった。そこでこのA55クローンの断片cDNA (以下、A55 SST断片cDNAと呼ぶ) について全長cDNAのクローニングを試みた。また推定されるアミノ酸配列を既知のシグナルペプチドと比較することによりA55 SST断片cDN

25

Aが機能的かつ構造的にもシグナルペプチドを有することを確認した。

#### 実施例4：全長cDNAのクローニングおよび全塩基配列の決定

マウス13日胎児心臓cDNAライブラリー (Uni-ZAP XR) (Stratagen より購入) のファージ粒子を大腸菌XL1-Blue MRF\*株に感染させて得られた100万プラークをナイロンメンブレンにトランスファーした。<sup>32</sup>P標識したマウスA55 SST断片cDNAをプローブとしてプラークハイブリダイゼーションを行ない、多数の陽性プラークを得た。

その中の1プラークからファージを調製し、エクサアシスト・ヘルパー・ファージ (ExAssist helper phage, Stratagene より購入)と共に大腸菌XL1-Blue MRF\*株 (Stratagene より購入) に感染させ、ファージミド (pBluescript SK(-)) に変換した。ファージミドを大腸菌DH5a株に感染させた後、形質転換体よりプラスミドを調製した。初めに5'側の塩基配列を決定してマウスA55 SST断片cDNAの塩基配列が存在することを確認した後、全塩基配列を決定し、配列番号3に示す配列を得た。

さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号2に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号1に示す推定アミノ酸配列を得た。本ポリペプチドの成熟蛋白は、配列番号3に示される (配列番号3のアミノ酸配列144~1418間の領域) 425アミノ酸、または配列番号4に示される423アミノ酸であると推定される。配列番号5は、配列番号4のポリペプチドの翻訳領域を表わす。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して BLASTN および FASTA により、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTX、BLASTP および FASTA により検索した結果、本発明のポリペプチド (マウスA55ポリペプチドと呼ぶ) およびそれをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。

さらに得られたアミノ酸配列の疎水性プロットによる解析から、本発明のマウスA 5 5ポリペプチドは膜貫通領域を持たないことも明らかとなり、本発明のマウスA 5 5ポリペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

- 5       しかし、モチーフ検索の結果から、A 5 5は6カ所のEGF様ドメインを有することが判明した。この結果に基づいて、クローンA 5 5は、少なくともEGFファミリーと同様な活性を保持すると期待される。また BLASTX、BLASTP および FASTA は、マウス A 5 5クローン（配列番号1のアミノ酸配列1～448間の領域）とヒトS 1-5（Swiss Prot Accession HSU03877）  
10       のアミノ酸配列1～387間の領域）の間に有為な相同性があることを示した。ヒトS 1-5は繊維芽細胞より増殖抑制時期に発現が誘導される分泌蛋白質で、細胞増殖に関連した活性を有することが報告されている（Beata Lecka-Czernik et. al. Mol.Cell.Biol.15 120-128 1995）。さらにその他のEGF様ドメインを有する多くの蛋白とも相同性を示した。

15

#### 実施例5：マウスA 5 5蛋白アイソフォーム遺伝子の単離

- 転写開始点を決定するためにマラソンcDNAアンプリフィケーションキット（Marathon cDNA Amplification Kit, 商品名、Clontech 社より購入）による5' RACE（Rapid Amplification of cDNA End）法を用いて5'末端cD  
20       NAのクローニングを行なった。鋳型2本鎖cDNAの調製には、マウス胎児心臓組織のpoly（A）<sup>+</sup>RNAより作製した。

- 全長の塩基配列の情報に基づいてプライマーmA 5 5-R 1：5'-CGTTTG TGCACTGCTGCTGTGCATTCC-3'（配列番号17）を作製して、該キットに添付されたアダプタープライマーとでPCRを  
25       行なった。増幅されたcDNAをアガロース電気泳動で分画後、pGEM-T Vector（商品名、Promega より購入）に連結し、大腸菌DH 5  $\alpha$ に形質転

換してプラスミドを調製し、全塩基配列を決定した。その結果、配列番号 3 で示された翻訳開始点 A T G を含む 5 ' 末端配列と異なる 5 ' 末端配列を有するクローンを見い出した（配列番号 7 および 8）。

5 染色体遺伝子の解析から、配列番号 8 で示されたクローンは配列 3 で示されたクローンのエクソン 1 部分が約 4 0 0 塩基下流に存在する別のエクソンを利用しており、選択的スプライシングによって生じたクローンであることが判明した。その結果該クローンは配列番号 1 で示された N 末端の 6 アミノ酸が 1 9 アミノ酸に置換されたアイソフォーム蛋白（配列番号 6 に示す）をコードすることが判明した。

10 本ポリペプチドの成熟蛋白は、配列番号 8 に示される（配列番号 8 のアミノ酸配列 3 4 0 ~ 1614 間の領域） 4 2 5 アミノ酸または、配列番号 9 に示される 4 2 3 アミノ酸であると推定される。配列番号 1 0 は、配列番号 9 のポリペプチドの翻訳領域を表わす。

#### 15 実施例 6 : ヒト A 5 5 遺伝子の塩基配列の決定

実施例 4 の相同性検索の過程で、本発明者らはマウス A 5 5 の塩基配列の 5 ' 末端と相同性を有するヒト E S T 配列（GENBANK Accession H17726）を見い出した。

そこで、本発明者らは、GENBANK Accession H17726 に記載された塩基配列を有するヒト脳 c D N A ライブラリー由来のクローン（Clone ID 50483）を  
20 アメリカンタイプ・カルチャーコレクション（ATCC）より入手し、マウス A 5 5 と同様の方法で全塩基配列を決定した。その結果、配列番号 1 3 に示す塩基配列を得た後、さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号 1 2 に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号 1 1 に示す推定アミノ酸配列  
25 を得た。

以上のことから、該ヒトクローンは全長であること、およびマウス A 5 5

に対してDNA（アミノ酸翻訳領域）レベルで 89.3%、アミノ酸レベルで 94.2%一致していることが判明し、マウスA 5 5に対するヒトカウンターパートであることが示唆された（以下、該ヒトクローンをヒトA 5 5と呼ぶ。）。本ポリペプチドの成熟蛋白は、配列番号 1 3 に示される（配列番号 1 3 のア  
5 ミノ酸配列 2 3 8 ~1512 間の領域） 4 2 5 アミノ酸、または配列番号 1 4 に示される 4 2 3 アミノ酸であると推定される。配列番号 1 5 は、配列番号 1 4 のポリペプチドの翻訳領域を表わす。

このヒトA 5 5についても核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して BLASTN および FASTA により、またアミノ酸配列データ  
10 ベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTX、BLASTP および FASTA により検索したが、マウスA 5 5と同様に一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドも、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

#### 15 実施例 7：哺乳動物細胞を用いたマウスA 5 5 蛋白の発現

配列番号 3 で示されたマウス全長 cDNA を哺乳動物細胞用発現ベクター p N o t S （Kaufman et al., Nucleic Acids Res.19,4485-4490(1991)参照）に連結し、マウスA 5 5 蛋白発現用プラスミド p N o t S - m A 5 5 を構築した。p N o t S および p N o t S - m A 5 5 をリポフェクチン（商品名、  
20 GIBCOBRL より購入）を用いて 2 9 3 T 細胞（ATCC CRL-1573 2 9 3 細胞に S V 4 0 T 抗原を導入した細胞株）に導入し、1 9 時間後に  $^{35}$ S - メチオニン（M e t）を添加した M e t フリーの培地に交換して 3 0 分間ラベルした後、M e t を含む培地で 5 時間培養を行なった。細胞上清を回収後、セントリコン- 1 0（商品名、Amicon より購入）にて約 1 0 倍に濃縮し、S D S  
25 - P A G E を行なった。アクリルアミドゲルを乾燥させた後、 $^{35}$ S でラベルされた蛋白質の発現を BAS2000（富士フィルム）を用いて検出した。

その結果 pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清には、発現ベクター pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清には認められないバンドが 6 0 ~ 7 0 k D a 付近に検出された。このことから組み換えマウス A 5 5 蛋白が発現し、培養上清中に分泌していることが確認された。

- 5      このマウス A 5 5 組み換え蛋白の分子量はアミノ酸組成から計算されるマウス A 5 5 の分子量 4 8 k D a よりも大きく、マウス A 5 5 蛋白には 2 ヶ所の N 型糖付加部位と O 型糖鎖が付加しうる S e r および T h r 残基が多数存在することから、N 型および O 型糖鎖が付加されていると予想された。

10    実施例 8 : マウス A 5 5 蛋白によるラット血管平滑筋細胞増殖阻害作用の測定

          新生化学実験講座 1 0 「血管 内皮と平滑筋」(日本生化学会編)に記載の方法にしたがい、ラットの心臓から横隔膜に至る大動脈より血管平滑筋細胞を単離し初代培養を行なった。

- 15      ヒト P D G F - B B ( G E N Z Y M E 社製) 1, 3 または 1 0 n g / m l と同時に、実施例 7 の方法で pN o t S または pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を全培地量の 1 0 % になるように添加し、細胞増殖 E L I S A, B r d U 発色キット(商品名、ベーリンガーマンハイムより購入)の方法にしたがって、血管平滑筋細胞の B r d U の取り込を測定した。

- 20      その結果、図 1 で示したように、ラット血管平滑筋細胞は pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合は無添加の場合と比較して無影響であったが、pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合は有意な B r d U の取り込み阻害が認められた。

- また P D G F を 1, 3, 1 0 n g / m l の濃度で添加して、濃度依存的に  
25      ラット血管平滑筋細胞における B r d U の取り込みを上昇させた場合においても、pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を同時に添加した

場合は無添加の場合と比較して無影響であったが、pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合には有意な B r d U の取り込み阻害が認められた（図 1 参照）。

このことから、組み換えマウス A 5 5 蛋白は血管平滑筋細胞に対して増殖  
5 阻害活性を有することが明らかとなった。

#### 実施例 9：哺乳動物細胞を用いたヒト A 5 5 蛋白の発現

配列番号 1 3 で示されたヒト全長 cDNA を哺乳動物細胞用発現ベクター pN o t S （Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991) 参照）の下流  
10 に連結し、ヒト A 5 5 蛋白発現用プラスミド pN o t S - h A 5 5 を構築した。pN o t S および pN o t S - h A 5 5 をリポフェクチン（商品名、GIBCOBRL より購入）を用いて C o s 1 細胞に導入し、24 時間後に M e t フリーの培地に交換した後、 $^{35}\text{S}$ -M e t,  $^{35}\text{S}$ -C y s を添加して 5 時間培養を行なった。細胞上清を回収後、セントリコンー 1 0 （商品名、Amicon  
15 より購入）にて約 10 倍に濃縮し、SDS-PAGE を行なった。アクリルアミドゲルを乾燥させた後、 $^{35}\text{S}$  でラベルされた蛋白質の発現を BAS2000（富士フィルム）を用いて検出した。

その結果、pN o t S - h A 5 5 を導入した C o s 1 細胞の培養上清には、発現ベクターのみを導入した C o s 1 細胞の培養上清には認められないバン  
20 ドが 60 ~ 70 kDa 付近に検出された。このことから組み換えヒト A 5 5 蛋白が発現し、培養上清中に分泌していることが確認された。またマウス A 5 5 と同様にヒト A 5 5 蛋白も糖鎖が付加されていると予想された。

実施例 10：ヒト A 5 5 蛋白によるラット血管平滑筋細胞株増殖阻害作用の  
25 測定

配列番号 1 3 の 2 3 8 番目から 1515 番目の DNA および配列番号 1 5 で

示された cDNA にストップコドン を付加した DNA をそれぞれ、ミツバチの  
メラティンのシグナルペプチドに続いて 6 個のヒスチジン残基が連続したタ  
グ配列およびエンテロキナーゼ切断配列をコードする DNA の 3' 下流に連  
結して、哺乳動物細胞用発現ベクター pNotS のプロモーターの下流に挿  
5 入し、ヒト A55 蛋白発現用プラスミドを構築した。発現ベクターのみおよ  
びヒト A55 蛋白発現用ベクターをリポフェクチン（商品名、GIBCOBRL よ  
り購入）を用いて Cos1 細胞に導入し、細胞上清を回収後、エンテロキナ  
ーゼで消化し、ニッケルカラムで切断されたリンカー配列を除去した。さら  
にセントリコン-10（商品名、Amicon より購入）にて元の培養上清に対し  
10 て約 10 倍に濃縮した。

ラット血管平滑筋細胞株（ATCC CRL-1444）を 96 穴プレートにまいて、  
10% 血清存在下で 24 時間培養した後、各種濃度（1, 10 または 50 ng/  
ml）のヒト PDGF-BB（GENZYME 社製）を含む無血清培地に交  
換し 24 時間インキュベートした。その際同時に上記の方法で処理した発現  
15 ベクターのみまたはヒト A55 蛋白発現用ベクターを導入した Cos1 細胞  
の培養上清を培地量の 10% になるように添加した。24 時間培養後に <sup>3</sup>H-  
チミジン 0.5mCi/穴を添加し、4 時間培養後に細胞に取りこまれた <sup>3</sup>H を  
測定した。その結果図 2 に示したように、PDGF を 1, 10, 50 ng/  
ml の濃度で添加し、濃度依存的にラット平滑筋細胞株における <sup>3</sup>H-チミジ  
20 ンの取り込みを上昇させた場合において、発現ベクターのみを導入した Cos1  
細胞の培養上清を同時に添加した場合は、無添加の場合と比較して無影  
響であったが、ヒト A55 蛋白発現用ベクターを導入した Cos1 細胞の培  
養上清を添加した場合には顕著な <sup>3</sup>H-チミジンの取り込み低下が認められ  
た（図 2 参照）。

25 さらに別のラット血管平滑筋細胞株（ATCC CRL-1476 および CRL-2018）  
とヒト血管平滑筋細胞株（ATCC CRL-1999）においても同様の活性が認められ

た。このことから、組み換えヒトA55蛋白はマウスA55蛋白と同様に血管平滑筋細胞に対する増殖阻害活性を有することが明らかとなった。

また培養上清を添加して、24時間培養後に細胞を顕微鏡下で観察すると、pNots-hA55を導入したCos1細胞の培養上清を添加した場合にのみ、血管平滑筋細胞の形態変化が認められた。しかし同様の実験においてメラノーマ細胞株SK-MEL-28の形態には無影響であった。さらにヒトA55蛋白はケモカインJEおよびKCの発現を誘導することも明らかとなった。

#### 10 実施例11：抗A55蛋白ポリクローナル抗体の作製

固相法により合成した3種類のマウスA55部分ペプチド

RTNPVYRGPYSNPYSTSYSG (71-90) (配列番号1の48-67)

GAYYIFQIKSGNEGREFYMR (376-395) (配列番号1の353-372)

MTRPIKGPRDIQLDLEMITVN (406-426) (配列番号1の383-403)

を免疫原としてウサギに免疫して、抗体価の測定後血清を採取した。得られた血清を各々免疫原としたペプチド断片を結合させたアフィニティーカラム

20 により抗マウスA55蛋白ポリクローナル抗体を精製した。

実施例7と同じ方法で調製した培養上清をSDS-PAGEにかけた後、蛋白をアクリルアミドゲルからイモビロネーP (PVDF膜、商品名、ミリポアより購入) にトランスファーした。作製した抗マウスA55ポリクローナル抗体を一次抗体としてECLキット (商品名、アマシャムより購入) を用いて発色し、組み換えマウスA55蛋白を検出した。

その結果、マウスA55発現ベクターpNots-mA55を導入した細

- 胞の培養上清には実施例 7 で記載した<sup>35</sup>S ラベルの実験と同じ位置である 60 k D a 付近に単一のバンドが検出された。一方発現ベクター p N o t S のみを導入した細胞の上清には 60 k D a 付近にバンドは検出されなかった。このことから得られたポリクローナル抗体はマウス A 5 5 蛋白を特異的に認識していることが確認された。
- 5

## 請求の範囲

1. 実質的に純粋な形である配列番号 1 1 または 1 4 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログからなるポリペプチド。  
5
2. 配列番号 1 1 または 1 4 で示されるアミノ酸配列からなる請求の範囲第 1 項記載のポリペプチド。
- 10 3. 請求の範囲第 1 項に記載されたポリペプチドをコードする c DNA。
4. 配列番号 1 2 または 1 5 で示される塩基配列からなる請求の範囲第 3 項記載の c DNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる c DNA。  
15
5. 配列番号 1 3 で示される塩基配列からなる請求の範囲第 3 項記載の c DNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる c DNA。
- 20 6. 請求の範囲第 3 項から第 5 項のいずれかの項に記載の c DNA からなる複製または発現ベクター。
7. 請求の範囲第 6 項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。
- 25 8. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドを発現させる

ための条件下で請求の範囲第 7 項記載の宿主細胞を培養することからなる該ポリペプチドの製造方法。

9. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

10. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドまたは請求の範囲第 9 項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

10

11. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする異常な平滑筋の増殖に係る疾患の治療に有効な薬学的組成物。

- 15 12. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする動脈硬化または経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫の治療に有効な請求の範囲第 11 項記載の薬学的組成物。

- 20 13. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドを用いて、該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

図 1

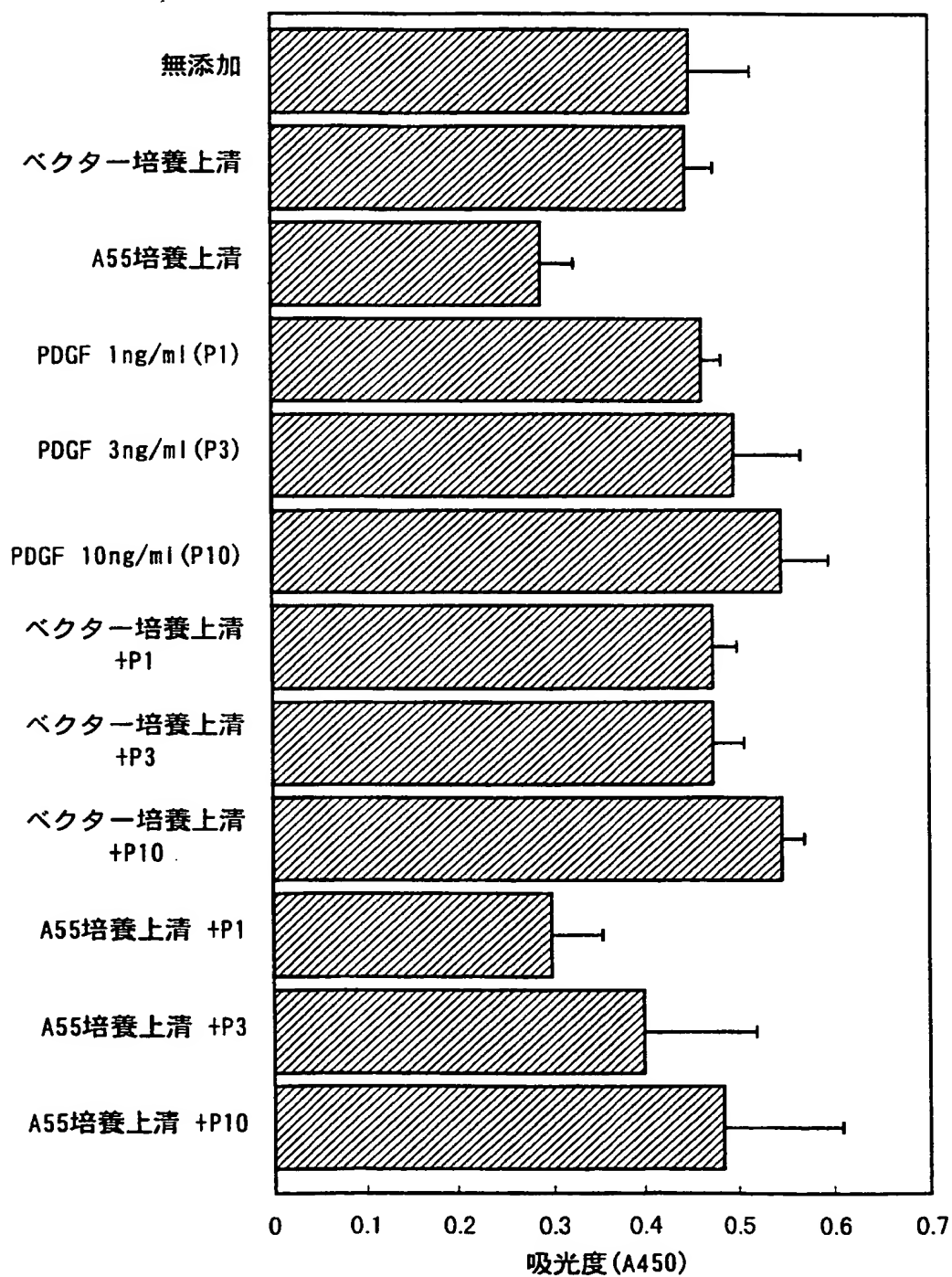
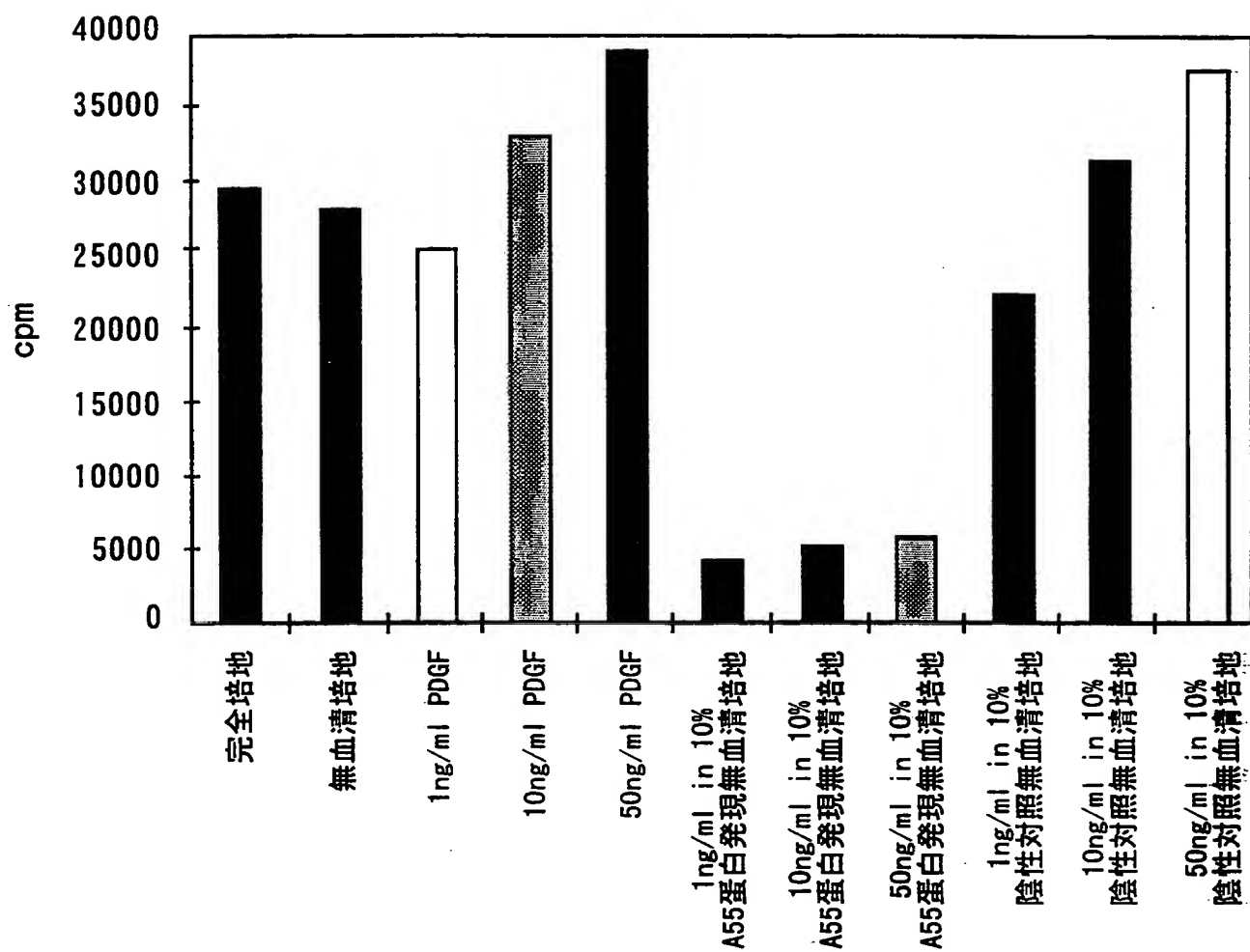




図 2





## SEQUENCE LISTING

<110> Ono Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel polypeptides, cDNA coding these polypeptides and Use thereof

<130> ONF-2970PCT

<141> 1999-04-28

<150> JP 10-119731

<151> 1998-04-28

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp

-23

-20

-15

-10

Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp

-5

1

5



Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr  
 10 15 20 25  
 Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly  
 30 35 40  
 Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr  
 45 50 55  
 Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala  
 60 65 70  
 Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val  
 75 80 85  
 Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val  
 90 95 100 105  
 Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys  
 110 115 120  
 Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp  
 125 130 135  
 Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr  
 140 145 150  
 Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys  
 155 160 165  
 Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val  
 170 175 180 185  
 Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr  
 190 195 200  
 Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu  
 205 210 215



Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe  
 220 225 230  
 Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser  
 235 240 245  
 Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp  
 250 255 260 265  
 Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr  
 270 275 280  
 Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys  
 285 290 295  
 Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala  
 300 305 310  
 Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp  
 315 320 325  
 Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met  
 330 335 340 345  
 Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys  
 350 355 360  
 Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile  
 365 370 375  
 Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile  
 380 385 390  
 Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg  
 395 400 405  
 Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
 410 415 420 425



<210> 2

<211> 1344

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgccaggat taaaaaggat actcactgtt accatcttgg cactctggct tccacatcct 60  
gggaatgcac agcagcagtg cacaaacggc ttgacctgg accgccagtc aggacagtgt 120  
ctagataattg atgaatgccg gaccatccct gaggcctgtc gttggggacat gatgtgtgtc 180  
aaccagaaatg gcgggtatit gigcalccct cgaaccaacc cagtgtatcg agggccttac 240  
tcaaatecct actctacatc ctactcaggc ccataccag cagcggcccc accagiacca 300  
gcttccaact accccacgat ttcaaggcct ctgtctgcc gctttgggtt tcagatggat 360  
gaaggcaacc agtgtgtgga tgtggacgag tgtgcaacag actcacacca gtgcaaccct 420  
accagatct gtatcaacac tgaaggaggt tacacctgct cctgcaccga tgggtactgg 480  
cttctggaag ggcagtgcc agatattgat gaatgtcgt atggttactg ccagcagctc 540  
tgtgcaaatg ttccaggatc ctattcctgt acatgcaacc ctggtttcac cctcaacgac 600  
gatggaaggi ctgccaaga tgtgaacgag tgcgaaactg agaatecctg tgttcagacc 660  
tgtgtcaaca cctatggctc ttcatctgc cgctgtgacc caggatatga acttgaggaa 720  
gatggcattc actgcagtga tatggacgag tgcagcttct ccgagttcct ctgtcaacac 780  
gagtgtgtga accagccggg ctcatattc tgctctgcc ctccaggcta cgtcctgttg 840  
gatgataacc gaagctgcca ggatatcaat gaatgtgagc accgaaacca cacgigiacc 900  
tcactgcaga ctgtctaaa tctacaaggg ggcttcaa atgtatgatcc catcagctgt 960  
gaggagcctt atctgtgat tggigaaaac cgctgtatgt gtcctgtga gcacaccagc 1020  
tgcagagacc agccattcac catcctgtat cgggacatgg atgtggtgtc aggacgctcc 1080



gttccctgctg acatcttcca gatgcaagca acaacccgat accctgggtgc ctattacatt 1140  
ttccagatca aaictggcaa cgagggctga gagttctata tgcggcaaac agggcctatc 1200  
agtgccaccc tggatgac acgccccatc aaagggcctc gggacatcca gctggacttg 1260  
gagatgatca ctgtcaacac tgtcatcaac ttccagaggca gctccgtgat ccgactgcgg 1320  
atatatgtgt cgcagtatcc gttc 1344

<210> 3

<211> 2233

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Clone mouse A55 derived from Day 13 mouse embryonic heart

<220>

<221> CDS

<222> (75).. (1418)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (75).. (143)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (144).. (1418)



&lt;400&gt; 3

aattcggcac gagccccagt cccaccgcag agcctgcctt cctcgcgicg cttctcctcc 60

cgcgcatactt ggat atg cca gga tta aaa agg ata ctc act gtt acc atc 110

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile

-20

-15

ttg gca ctc tgg ctt cca cat cct ggg aat gca cag cag cag tgc aca 158

Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr

-10

-5

-1

1

5

aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca gga cag tgt cta gat att gat 206

Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp

10

15

20

gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt cgt ggg gac atg atg tgt gtc 254

Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val

25

30

35

aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc cct cga acc aac cca gtg tat 302

Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr

40

45

50

cga ggg cct tac tca aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac 350

Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr

55

60

65

cca gca gcg gcc cca cca gta cca gct tcc aac tac ccc acg att tca 398

Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser

70

75

80

85

agg cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag 446

Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 90  | 95  | 100 |     |
| tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gac tca cac cag tgc aac cct |     |     | 494 |
| Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro |     |     |     |
| 105   | 110 | 115 |     |
| acc cag atc tgt atc aac act gaa gga ggt tac acc tgc tcc tgc acc |     |     | 542 |
| Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr |     |     |     |
| 120   | 125 | 130 |     |
| gat ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt |     |     | 590 |
| Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys |     |     |     |
| 135   | 140 | 145 |     |
| cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gca aat gtt cca gga tcc tat |     |     | 638 |
| Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr |     |     |     |
| 150   | 155 | 160 | 165 |
| tcc tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc ctc aac gac gat gga agg tct |     |     | 686 |
| Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser |     |     |     |
| 170   | 175 | 180 |     |
| tgc caa gat gtg aac gag tgc gaa act gag aat ccc tgt gtt cag acc |     |     | 734 |
| Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr |     |     |     |
| 185   | 190 | 195 |     |
| tgt gtc aac acc tat ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat |     |     | 782 |
| Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr |     |     |     |
| 200   | 205 | 210 |     |
| gaa ctt gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gac gag tgc agc |     |     | 830 |
| Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser |     |     |     |
| 215   | 220 | 225 |     |
| ttc tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca |     |     | 878 |



Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser  
 230 235 240 245  
 tac ttc tgc tgc tgc cct cca ggc tac gtc ctg ttg gat gat aac cga 926  
 Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg  
 250 255 260  
 agc tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cga aac cac acg tgt acc 974  
 Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr  
 265 270 275  
 tca ctg cag act tgc tac aat cta caa ggg ggc ttc aaa tgt att gat 1022  
 Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp  
 280 285 290  
 ccc atc agc tgt gag gag cct tat ctg ctg att ggt gaa aac cgc tgt 1070  
 Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys  
 295 300 305  
 atg tgt cct gct gag cac acc agc tgc aga gac cag cca ttc acc atc 1118  
 Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile  
 310 315 320 325  
 ctg tat cgg gac atg gat gtg gtg tca gga cgc tcc gtt cct gct gac 1166  
 Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp  
 330 335 340  
 atc ttc cag atg caa gca aca acc cga tac cct ggt gcc tat tac att 1214  
 Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile  
 345 350 355  
 ttc cag atc aaa tct ggc aac gag ggt cga gag ttc tat atg cgg caa 1262  
 Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln  
 360 365 370



aca ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg 1310  
 Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly  
 375 380 385  
 cct cgg gac atc cag ctg gac ttg gag atg atc act gtc aac act gtc 1358  
 Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val  
 390 395 400 405  
 atc aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tgc 1406  
 Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser  
 410 415 420  
 cag tat ccg ttc tgagcctctg gctaaggcct ctgacactgc cttcaccag 1458  
 Gln Tyr Pro Phe  
 425  
 caccgaggga cgggaggaga aaggaaacca gcaagaatga gagcgagaca gacattgcac 1518  
 ctttctctgct gaatatctcc tgggggcaic agcctagcat cttgacccat atctgtacta 1578  
 ttgcagatgg tcactctgaa ggacacccig ccttcagtic ctatgatgca gttatccaaa 1638  
 agtgttcatic ttagccccig atatgagggt gccagtgact cticcaaagcc ttccatttat 1698  
 ttccatcggt ttataaaaaa gaaaatagat tagatttgct ggggtatgag tcctcgaagg 1758  
 ttcaaaagac tgagtggcct gctctcacct ctctctctcc ttcttccatc tcttgctgca 1818  
 ttgctgcttt gcaaaagtc tcatgggctc gtgggaaatg ctgggaatag ctagtittgct 1878  
 tcttgcatgt tctgagaagg ctatgggaac acaccacagc aggaicgaag gtttttatag 1938  
 agtctatitit aaaalcacat ctggtaittit cagcataaaa gaaattittag ttgtctttta 1998  
 aatttgatg agtgittaac cttttcttat tcattitgag gcttctttaa gtggtagaat 2058  
 tccttccaaa ggccctcagat acatgittat ttacagictit ccaacctcat ctttctctgc 2118  
 atcttagccc agtttttacg aagacccctt aatcatgctt tnttaagagt ttttacccaa 2178  
 ctgcgttggga agacagaggt atccagactg attaaataat tgaagaaaaa aaaaa 2233



&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 423

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu

1

5

10

15

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met

20

25

30

Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn

35

40

45

Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser

50

55

60

Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro

65

70

75

80

Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu

85

90

95

Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln

100

105

110

Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys

115

120

125

Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile

130

135

140

Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp |     |     |     |
|   | 165 | 170 | 175 |
| Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys |     |     |     |
|   | 180 | 185 | 190 |
| Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp |     |     |     |
|   | 195 | 200 | 205 |
| Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp |     |     |     |
|   | 210 | 215 | 220 |
| Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp |     |     |     |
|   | 245 | 250 | 255 |
| Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His |     |     |     |
|   | 260 | 265 | 270 |
| Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys |     |     |     |
|   | 275 | 280 | 285 |
| Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu |     |     |     |
|   | 290 | 295 | 300 |
| Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val |     |     |     |
|   | 325 | 330 | 335 |
| Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala |     |     |     |
|   | 340 | 345 | 350 |
| Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr |     |     |     |



355                      360                      365  
 Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro  
 370                      375                      380  
 Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val  
 385                      390                      395                      400  
 Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile  
                          405                      410                      415  
 Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
                          420

<210> 5

<211> 1269

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

cagtcacaa acggctttga cctggaccgc cagtcaggac agtgtctaga tattgatgaa 60  
 tgccggacca tccctgaggc ttgtcgtggg gacatgatgt gtgtcaacca gaatggcggg 120  
 tatttgtgca tccctcgaac caaccagtg tatcgagggc ctactcaaa tccctactct 180  
 acatcctact caggcccata cccagcagcg gccccaccag taccagcttc caactacccc 240  
 acgatitcaa ggctcttgt ctgccgcttt gggtatcaga tggatgaagg caaccagtgt 300  
 gttgatgtgg acgagtgtgc aacagactca caccagtgc accctacca gatctgtatc 360  
 aacactgaag gaggttacac ctgctcctgc accgatgggt actggcttct ggaagggcag 420  
 tgcctagata ttgatgaatg tcgctatggt tactgccagc agctctgtgc aaatgttcca 480  
 ggatcctatt cctgtacaig caaccctggt ttaccctca acgacgatgg aaggtcttgc 540



caagatgtga acgagtgca aactgagaat cctgtgttc agacctgtgt caacacctat 600  
 ggctctttca tctgccgtg tgaccagga tatgaacttg aggaagatgg caticactgc 660  
 agtgatatgg acgagtgca cttctccgag ttctctgtc aacacgagtg tgtgaaccag 720  
 ccgggctcat acttctgtc gtgcccacca ggctacgtcc igtiggaiga taaccgaagc 780  
 tgccaggata tcaatgaatg tgagcaccga aaccacacgt gtaccicact gcagacitgc 840  
 tacaatctac aagggggctt caaatgtatt gatcccatca gctgtgagga gccttaicig 900  
 ctgattggig aaaaccgtg tatgtgtcct gctgagcaca ccagctgcag agaccagcca 960  
 ttcaccaicc tgtatcggga catggaatgt gtgtcaggac gctccgttcc tgcigacatc 1020  
 ttccagaatgc aagcaacaac ccgataccct ggtgccatatt acattttcca gatcaaatct 1080  
 ggcaacgagg gtcgagagtt ctatatgcgg caaacagggc ctatcagtgc caccctggig 1140  
 atgacacgcc ccatcaaagg gccctgggac atccagctgg acttggagat gatcacitgc 1200  
 aacactgtca tcaacttcag aggcagctcc gtgatccgac tgcggatata tgtgtcgcag 1260  
 tatccgttc 1269

<210> 6

<211> 461

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln

-35

-30

-25

Arg Arg Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His

-20

-15

-10

-5

Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | -1  | 1   |     | 5   |     | 10  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Ser | Gly | Gln | Cys | Leu | Asp | Ile | Asp | Glu | Cys | Arg | Thr | Ile | Pro | Glu |
|     | 15  |     |     | 20  |     | 25  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Cys | Arg | Gly | Asp | Met | Met | Cys | Val | Asn | Gln | Asn | Gly | Gly | Tyr | Leu |
|     | 30  |     |     | 35  |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Ile | Pro | Arg | Thr | Asn | Pro | Val | Tyr | Arg | Gly | Pro | Tyr | Ser | Asn | Pro |
|     | 45  |     |     | 50  |     | 55  |     |     |     |     |     |     |     | 60  |     |
| Tyr | Ser | Thr | Ser | Tyr | Ser | Gly | Pro | Tyr | Pro | Ala | Ala | Ala | Pro | Pro | Val |
|     |     |     | 65  |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     | 75  |     |     |
| Pro | Ala | Ser | Asn | Tyr | Pro | Thr | Ile | Ser | Arg | Pro | Leu | Val | Cys | Arg | Phe |
|     | 80  |     |     | 85  |     | 90  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Tyr | Gln | Met | Asp | Glu | Gly | Asn | Gln | Cys | Val | Asp | Val | Asp | Glu | Cys |
|     | 95  |     |     | 100 |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Thr | Asp | Ser | His | Gln | Cys | Asn | Pro | Thr | Gln | Ile | Cys | Ile | Asn | Thr |
|     | 110 |     |     | 115 |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Gly | Gly | Tyr | Thr | Cys | Ser | Cys | Thr | Asp | Gly | Tyr | Trp | Leu | Leu | Glu |
|     | 125 |     |     | 130 |     | 135 |     |     |     |     |     |     |     | 140 |     |
| Gly | Gln | Cys | Leu | Asp | Ile | Asp | Glu | Cys | Arg | Tyr | Gly | Tyr | Cys | Gln | Gln |
|     |     |     | 145 |     |     | 150 |     |     |     |     |     |     | 155 |     |     |
| Leu | Cys | Ala | Asn | Val | Pro | Gly | Ser | Tyr | Ser | Cys | Thr | Cys | Asn | Pro | Gly |
|     | 160 |     |     | 165 |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Asn | Asp | Asp | Gly | Arg | Ser | Cys | Gln | Asp | Val | Asn | Glu | Cys |
|     | 175 |     |     | 180 |     | 185 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Thr | Glu | Asn | Pro | Cys | Val | Gln | Thr | Cys | Val | Asn | Thr | Tyr | Gly | Ser |
|     | 190 |     |     | 195 |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Ile | Cys | Arg | Cys | Asp | Pro | Gly | Tyr | Glu | Leu | Glu | Glu | Asp | Gly | Ile |



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 205   | 210 | 215 | 220 |
| His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln |     |     |     |
|   | 225 | 230 | 235 |
| His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro |     |     |     |
|   | 240 | 245 | 250 |
| Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu |     |     |     |
|   | 255 | 260 | 265 |
| Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn |     |     |     |
|   | 270 | 275 | 280 |
| Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro |     |     |     |
| 285   | 290 | 295 | 300 |
| Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr |     |     |     |
|   | 305 | 310 | 315 |
| Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val |     |     |     |
|   | 320 | 325 | 330 |
| Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr |     |     |     |
|   | 335 | 340 | 345 |
| Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn |     |     |     |
|   | 350 | 355 | 360 |
| Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr |     |     |     |
| 365   | 370 | 375 | 380 |
| Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp |     |     |     |
|   | 385 | 390 | 395 |
| Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser |     |     |     |
|   | 400 | 405 | 410 |
| Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe             |     |     |     |



415

420

425

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1383

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7

atgggacctt gaagtcttga gccaatgcac agtggactct gcagacagag acgcatgata 60  
ctcactgtta ccatcttggc actctggctt ccacatccctg ggaatgcaca gcagcagctc 120  
acaaacggct ttgacctgga ccgccagtca ggacagctgc tagatatga tgaatgccgg 180  
accatccctg aggcttctcg tggggacatg atgtgtgtca accagaatgg cgggtatttg 240  
tgcatccctc gaaccaaccc agtgtatcga gggccttact caaatcccta cctacatcc 300  
tactcaggcc catacccagc agcggcccca ccagtaccag ctccaacta cccacgatt 360  
tcaaggcctc ttgtctgccg ctttgggtat cagatggatg aaggcaacca gtgtgtggat 420  
gtggacgagt gtgcaacaga ctacaccag tgcaacccta cccagatctg tatcaacact 480  
gaaggagggt acacctgctc ctgcaccgat gggctactggc ttctggaagg gcagtccta 540  
gatattgatg aatgtcgcta tggttactgc cagcagctct gtgcaaatgt tccaggatcc 600  
tattcctgta catgcaaccc tggtttcacc ctcaacgacg atggaaggct ttgccaagat 660  
gtgaacgagt gcgaaactga gaatccctgt gttcagacct gtgtcaacac ctatggctct 720  
ttcatctgcc gctgtgaccc aggatatgaa cttaggaag atggcattca ctgcagtgat 780  
atggacgagt gcagcttctc cgagttctc tgtcaacacg agtgtgtgaa ccagccgggc 840  
tcatacttct gctctgccc tccaggctac gtctgttgg atgataaccg aagctgccag 900  
gatatcaatg aatgtgagca ccgaaaccac acgtgtacct cactgcagac ttgtiacaat 960  
ctacaagggg gcttcaaatg tattgatccc atcagctgtg aggagcctta tctgtgtatt 1020



ggtgaaaacc gctgtatgtg tcctgctgag cacaccagct gcagagacca gccattcacc 1080  
atcctgtatc gggacatgga tgggtgtca ggacgctccg ttcctgtga catcttcag 1140  
atgcaagcaa caaccgata ccctggtgcc tattacattt tccagatcaa atctggcaac 1200  
gagggtcgag agttctatat gcggcaaaca gggcctatca gtgccaccct ggtgatgaca 1260  
cgccccatca aagggcctcg ggacatccag ctggacttgg agatgatcac tgtcaacact 1320  
gicacaaact tcagaggcag ctccgtgatc cgactgcgga tatatgtgtc gcagtatccg 1380  
ttc 1383

<210> 8

<211> 2429

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Clone mouse A55b derived from Day 13 mouse embryonic heart

<220>

<221> CDS

<222> (232).. (1614)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (232).. (339)

<220>



&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (340).. (1614)

&lt;400&gt; 8

cagcatctcg agagaggcag cagacaacct cctagggtca ttctcttttc tttttggaaa 60  
 gggcagcaac gtgtgctgca gtttataaaa taccacacta catgtttttt aaatttggga 120  
 gactgctgac tacggcacca gcaattgctt tgcctgcgac gctgtgagac aagcagaagt 180  
 ctccgaacac ttctgtctgc gtttgcctca tgtgtgtgat ttacagaggg a atg gga 237

Met Gly

-35

cct aga agt ttc gag cca atg cac agt gga ctc tgc aga cag aga cgc 285  
 Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln Arg Arg

-30

-25

-20

atg ata ctc act gtt acc atc ttg gca ctc tgg ctt cca cat cct ggg 333  
 Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly

-15

-10

-5

aat gca cag cag cag tgc aca aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca 381  
 Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser

-1 1

5

10

gga cag tgt cta gat att gat gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt 429  
 Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys

15

20

25

30

cgt ggg gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc 477  
 Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile

35

40

45

cct cga acc aac cca gtg tat cga ggg cct tac tca aat ccc tac tct 525



Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser  
                     50                    55                    60  
 aca tcc tac tca ggc cca tac cca gca gcg gcc cca cca gta cca gct 573  
 Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala  
                     65                    70                    75  
 tcc aac tac ccc acg att tca agg cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat 621  
 Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr  
                     80                    85                    90  
 cag atg gat gaa ggc aac cag tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca 669  
 Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr  
                     95                    100                    105                    110  
 gac tca cac cag tgc aac cct acc cag atc tgt atc aac act gaa gga 717  
 Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly  
                     115                    120                    125  
 ggt tac acc tgc tcc tgc acc gat ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag 765  
 Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln  
                     130                    135                    140  
 tgc cta gat att gat gaa tgt cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt 813  
 Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys  
                     145                    150                    155  
 gca aat gtt cca gga tcc tat tcc tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc 861  
 Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr  
                     160                    165                    170  
 ctc aac gac gat gga agg tct tgc caa gat gtg aac gag tgc gaa act 909  
 Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr  
                     175                    180                    185                    190



gag aat ccc tgt gtt cag acc tgt gtc aac acc tat ggc tct ttc atc 957

Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile

195

200

205

tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa gat ggc att cac tgc 1005

Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys

210

215

220

agt gat atg gac gag tgc agc ttc tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag 1053

Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu

225

230

235

tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac ttc tgc tgc tgc cct cca ggc tac 1101

Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr

240

245

250

gtc ctg ttg gat gat aac cga agc tgc cag gat atc aat gaa tgt gag 1149

Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu

255

260

265

270

cac cga aac cac acg tgt acc tca ctg cag act tgc tac aat cta caa 1197

His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln

275

280

285

ggg ggc ttc aaa tgt att gat ccc atc agc tgt gag gag cct tat ctg 1245

Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu

290

295

300

ctg att ggt gaa aac cgc tgt atg tgt cct gct gag cac acc agc tgc 1293

Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys

305

310

315

aga gac cag cca ttc acc atc ctg tat cgg gac atg gat gtg gtg tca 1341

Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser



320 325 330  
 gga cgc tcc gtt cct gct gac atc ttc cag atg caa gca aca acc cga 1389  
 Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg  
 335 340 345 350  
 tac cct ggt gcc tat tac att ttc cag atc aaa tct ggc aac gag ggt 1437  
 Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly  
 355 360 365  
 cga gag ttc tat atg cgg caa aca ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg 1485  
 Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val  
 370 375 380  
 atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct cgg gac atc cag ctg gac ttg gag 1533  
 Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu  
 385 390 395  
 atg atc act gtc aac act gtc atc aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc 1581  
 Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile  
 400 405 410  
 cga ctg cgg ata tat gtg tgc cag tat ccg ttc tgagcctctg gctaaggcct 1634  
 Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
 415 420 425  
 ctgacactgc ctttcaccag caccgaggga cgggaggaga aaggaaacca gcaagaatga 1694  
 gagcgagaca gacattgcac ctttcctgct gaatatctcc tggggggcacc agcctagcat 1754  
 cttgacccat atctgtacta ttgcagaagg tcacictgaa ggacacccctg cccctcagttc 1814  
 ctatgatgca gttatccaaa agtgttcacc ttagccccctg atatgagggt gccagtgact 1874  
 cttcaaagcc ttccatttat ttccatcggt ttataaaaaa gaaaatagat tagatttgct 1934  
 ggggtatgag tcctcgaagg ttcaaaagac tgagtggtt gctctcacct ctctctctcc 1994  
 ttcttccacc tcttgctgca ttgctgcttt gcaaaagtc tcatgggctc gtgggaaatg 2054



ctgggaatag ctatgttgc tcttgcatgt tctgagaagg ctatgggaac acaccacagc 2114  
 aggatcgaag gtttttatag agtctatitt aaaatcacat ctggtatitt cagcataaaa 2174  
 gaaatttttag ttgtcttttaa aatttgtaig agigtittaac cttttcttat tcattttgag 2234  
 gctttcttaaa gtggtagaat tctttccaaa ggcttcagat acatgttatg ttcagtcitt 2294  
 ccaacctcat cctttcttgc atcttagccc agtttttacg aagacccctt aatcatgctt 2354  
 inttaagagt ttttacccaa ctgcgttgga agacagaggt atccagactg attaaataat 2414  
 tgaagaaaaa aaaaa 2429

<210> 9

<211> 423

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Cys | Thr | Asn | Gly | Phe | Asp | Leu | Asp | Arg | Gln | Ser | Gly | Gln | Cys | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Ile | Asp | Glu | Cys | Arg | Thr | Ile | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Gly | Asp | Met |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Met | Cys | Val | Asn | Gln | Asn | Gly | Gly | Tyr | Leu | Cys | Ile | Pro | Arg | Thr | Asn |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| Pro | Val | Tyr | Arg | Gly | Pro | Tyr | Ser | Asn | Pro | Tyr | Ser | Thr | Ser | Tyr | Ser |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| Gly | Pro | Tyr | Pro | Ala | Ala | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Ala | Ser | Asn | Tyr | Pro |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |
| Thr | Ile | Ser | Arg | Pro | Leu | Val | Cys | Arg | Phe | Gly | Tyr | Gln | Met | Asp | Glu |



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 85  | 90  | 95  |
| Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln |     |     |     |
|   | 100 | 105 | 110 |
| Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys |     |     |     |
|   | 115 | 120 | 125 |
| Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile |     |     |     |
|   | 130 | 135 | 140 |
| Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp |     |     |     |
|   | 165 | 170 | 175 |
| Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys |     |     |     |
|   | 180 | 185 | 190 |
| Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp |     |     |     |
|   | 195 | 200 | 205 |
| Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp |     |     |     |
|   | 210 | 215 | 220 |
| Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp |     |     |     |
|   | 245 | 250 | 255 |
| Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His |     |     |     |
|   | 260 | 265 | 270 |
| Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys |     |     |     |
|   | 275 | 280 | 285 |
| Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu |     |     |     |



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 290   | 295 | 300 |     |
| Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val |     |     |     |
|   | 325 | 330 | 335 |
| Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala |     |     |     |
|   | 340 | 345 | 350 |
| Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr |     |     |     |
|   | 355 | 360 | 365 |
| Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro |     |     |     |
|   | 370 | 375 | 380 |
| Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile |     |     |     |
|   | 405 | 410 | 415 |
| Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe                                     |     |     |     |
|   | 420 |     |     |

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1269

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

cagigcaciaa acggctttga cctggaccgc cagtcaggac agtgtctaga tattgatgaa 60



tgcggacca tccctgaggc ttgtcgtggg gacatgatgt gtgtcaacca gaatggcggg 120  
 tatttgtgca tccctcgaac caaccagtg tatcgagggc ctactcaaa tccctactct 180  
 acatcctact caggccccata cccagcagcg gccccaccag taccagcttc caactacccc 240  
 acgatitcaa ggccctcttgt ctgccgttt gggtatcaga tggatgaagg caaccagtg 300  
 gtggatgtgg acgagtgtgc aacagactca caccagtgc accctaccca gatctgtatc 360  
 aacactgaag gaggttacac ctgtctctgc accgatgggt actggcttct ggaagggcag 420  
 tgcctagata ttgatgaatg tgcctatggt tactgccagc agctctgtgc aaatgttcca 480  
 ggatcctatt cctgtacatg caaccctggt ttaccctca acgacgatgg aaggcttgc 540  
 caagatgtga acgagtgcga aactgagaat cctgtgttc agacctgtgt caacacctat 600  
 ggctctttca tctgccgtg tgaccagga tatgaactg aggaagatgg catcactgc 660  
 agtgataatg acgagtgcag ctctccgag ttctctgtc aacacgagtg tgaaccag 720  
 ccgggctcat actctgtc gtgccctcca ggctacgtcc tgttgatga taaccgaagc 780  
 tgccaggata tcaatgaatg tgagcaccga aaccacagt gtacctact gcagactgc 840  
 tacaatctac aagggggctt caaatgtatt gatccatca gctgtgagga gccttatctg 900  
 ctgattgggtg aaaaccgtg tatgtgtct gctgagcaca ccagctgcag agaccagcca 960  
 ttaccatcc tgtatcggga catggaatgt gtgtcaggac gctccgttcc tctgacatc 1020  
 ttccagatgc aagcaacaac ccgatacct ggigcctatt acatitcca gatcaaatct 1080  
 ggcaacgagg gtcgagagtt ctatatgccg caaacagggc ctatcagtgc caccctggtg 1140  
 atgacacgcc ccatcaaagg gccctgggac atccagctgg acttgagat gatcactgtc 1200  
 aacactgtca tcaacttcag aggcagctcc gigtccgac tgcggatata tgtgtcgcag 1260  
 tatccgttc 1269

<210> 11

<211> 448

<212> PRT



&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

```

Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys
      -20              -15              -10
Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp
      -5              -1   1              5
Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr
    10              15              20              25
Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly
              30              35              40
Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr
              45              50              55
Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala
              60              65              70
Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile
              75              80              85
Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val
    90              95              100              105
Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys
              110              115              120
Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp
              125              130              135
Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr
              140              145              150
Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys

```



|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 155   | 160 | 165 |     |
| Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val |     |     |     |
| 170   | 175 | 180 | 185 |
| Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr |     |     |     |
|   | 190 | 195 | 200 |
| Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu |     |     |     |
|   | 205 | 210 | 215 |
| Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe |     |     |     |
|   | 220 | 225 | 230 |
| Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser |     |     |     |
|   | 235 | 240 | 245 |
| Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp |     |     |     |
| 250   | 255 | 260 | 265 |
| Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr |     |     |     |
|   | 270 | 275 | 280 |
| Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys |     |     |     |
|   | 285 | 290 | 295 |
| Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala |     |     |     |
|   | 300 | 305 | 310 |
| Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp |     |     |     |
|   | 315 | 320 | 325 |
| Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met |     |     |     |
| 330   | 335 | 340 | 345 |
| Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys |     |     |     |
|   | 350 | 355 | 360 |
| Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile |     |     |     |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 365 | 370 | 375 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Ala | Thr | Leu | Val | Met | Thr | Arg | Pro | Ile | Lys | Gly | Pro | Arg | Glu | Ile |
|     | 380 | 385 | 390 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Leu | Asp | Leu | Glu | Met | Ile | Thr | Val | Asn | Thr | Val | Ile | Asn | Phe | Arg |
|     | 395 | 400 | 405 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Ser | Val | Ile | Arg | Leu | Arg | Ile | Tyr | Val | Ser | Gln | Tyr | Pro | Phe |
| 410 |     | 415 |     |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1344

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

```

atgccaggaa taaaaaggat actcactgtt accattctgg ctctctgtct tccaagccct 60
gggaatgcac aggcacagtg cacgaatggc ttgacctgg atgcccagtc aggacagtgt 120
ttagatatig atgaatgccg aaccatcccc gaggcctgcc gaggagacat gatgtgtgtt 180
aaccaaaaig gcgggtatit atgcatcccc cggacaaacc ctgtgtatcg agggccctac 240
tcgaacccct actcgacccc ctactcaggt ccgtaccag cagctgcccc accactctca 300
gctccaaact atcccacgat ctccaggcct cttatatgcc gccttggata ccagatggat 360
gaaagcaacc aatgtgtgga tgtggacgag tgtgcaacag attcccacca gtgcaacccc 420
accagatct gcatcaatac tgaaggcggg tacacctgct cctgcaccga cggatatitg 480
cttctggaag gccagtgcit agacattgat gaatgtcgct atggttactg ccagcagctc 540
tgtgcgaatg ttccctggatc ctattcttgt acatgcaacc ctggttttac cctcaatgag 600
gatggaaggt ctigccaaga tgtgaacgag tgtgccaccg agaacccttg cgtgcaaacc 660

```



tgcgicaaca cctacggctc ttcatctgc cgcigigacc caggatatga acttgaggaa 720  
gaigggcttc atigcagta tatggacgag tgcagcttct ctgagttcct ctgccaacat 780  
gagtigigtga accagcccgg cacatacttc tgctcctgcc ctccaggcta catcctgctg 840  
gatgacaacc gaagctgcca agacatcaac gaatgtgagc acaggaacca cacgtgcaac 900  
ctgcagcaga cgigctacaa ttacaaggg ggcttcaaat gcatcgacct catccgctgt 960  
gaggagcctt atctgaggat cagtataaac cgctgtatgt gtccctgctga gaaccttggc 1020  
tgcagagacc agccctttac catcttgtac cgggacatgg acgtgggtgc aggacgtcc 1080  
gttcccgtg acatcttcca aatgcaagcc acgacccgt accctggggc ctattacatt 1140  
ttccagatca aatctgggaa tgagggcaga gaattttaca tgcggcaaac gggccccatc 1200  
agtgccaccc tggigatgac acgccccatc aaagggcccc gggaaatcca gctggacttg 1260  
gaaaatgata ctgtcaacac tgcatacaac ttacagaggca gtcccgatgat ccgactgcgg 1320  
atatatgigt cgcagiaccc attc 1344

<210> 13

<211> 2328

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Clone human A55 derived from human brain

<220>

<221> CDS

<222> (169).. (1512)



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (169).. (237)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (238).. (1512)

&lt;400&gt; 13

gacccggcgc tciccccgctg tcctctccac gactcgctcg gcccctctgg aataaaacac 60  
 ccgcgagccc cgagggccca gaggaggccg acgtgccga gctcctccgg gggicccgcc 120  
 cgcgagcttt ctctcgccct tcgcatctcc tcctcgcgcg tcttggac atg cca gga 177

Met Pro Gly

-23

ata aaa agg ata ctg act gtt acc att ctg gct ctg tgt ctt cca agc 225

Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys Leu Pro Ser

-20                      -15                      -10                      -5

cct ggg aat gca cag gca cag tgc acg aat ggc ttt gac ctg gat cgc 273

Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg

-1    1                      5                      10

cag tca gga cag tgt tta gat att gat gaa tgc cga acc atc ccc gag 321

Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu

15                      20                      25

gcc tgc cga gga gac atg atg tgt gtt aac caa aat ggc ggg tat tta 369

Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu

30

35

40



tgc att ccc cgg aca aac cct gtg tat cga ggg ccc tac tcg aac ccc 417  
 Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro  
 45 50 55 60  
 tac tcg acc ccc tac tca ggt ccg tac cca gca gct gcc cca cca ctc 465  
 Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu  
 65 70 75  
 tca gct cca aac tat ccc acg atc tcc agg cct ctt ata tgc cgc ttt 513  
 Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe  
 80 85 90  
 gga tac cag atg gat gaa agc aac caa tgt gtg gat gtg gac gag tgt 561  
 Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys  
 95 100 105  
 gca aca gat tcc cac cag tgc aac ccc acc cag atc tgc atc aat act 609  
 Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr  
 110 115 120  
 gaa ggc ggg tac acc tgc tcc tgc acc gac gga tat tgg ctt ctg gaa 657  
 Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu  
 125 130 135 140  
 ggc cag tgc tta gac att gat gaa tgt cgc tat ggt tac tgc cag cag 705  
 Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln  
 145 150 155  
 ctc tgt gcg aat gtt cct gga tcc tat tct tgt aca tgc aac cct ggt 753  
 Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly  
 160 165 170  
 ttt acc ctc aat gag gat gga agg tct tgc caa gat gtg aac gag tgt 801  
 Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys



175 180 185  
gcc acc gag aac ccc tgc gtg caa acc tgc gtc aac acc tac ggc tct 849  
Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser  
190 195 200  
ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa gat ggc gtt 897  
Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val  
205 210 215 220  
cat tgc agt gat atg gac gag tgc agc ttc tct gag ttc ctc tgc caa 945  
His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln  
225 230 235  
cat gag tgt gtg aac cag ccc ggc aca tac ttc tgc tcc tgc cct cca 993  
His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro  
240 245 250  
ggc tac atc ctg ctg gat gac aac cga agc tgc caa gac atc aac gaa 1041  
Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu  
255 260 265  
tgt gag cac agg aac cac acg tgc aac ctg cag cag acg tgc tac aat 1089  
Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn  
270 275 280  
tta caa ggg ggc ttc aaa tgc atc gac ccc atc cgc tgt gag gag cct 1137  
Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro  
285 290 295 300  
tat ctg agg atc agt gat aac cgc tgt atg tgt cct gct gag aac cct 1185  
Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro  
305 310 315  
ggc tgc aga gac cag ccc ttt acc atc ttg tac cgg gac atg gac gtg 1233



Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val

320

325

330

gtg tca gga cgc tcc gtt ccc gct gac atc ttc caa atg caa gcc acg 1281

Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr

335

340

345

acc cgc tac cct ggg gcc tat tac att ttc cag atc aaa tct ggg aat 1329

Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn

350

355

360

gag ggc aga gaa ttt tac atg cgg caa acg ggc ccc atc agt gcc acc 1377

Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr

365

370

375

380

ctg gtg atg aca cgc ccc atc aaa ggg ccc cgg gaa atc cag ctg gac 1425

Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp

385

390

395

ttg gaa atg atc act gtc aac act gtc atc aac ttc aga ggc agc tcc 1473

Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser

400

405

410

gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tcg cag tac cca ttc tgagcctcgg 1522

Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

415

420

425

gctggagcct ccgacgtgc cctcattgg caccaaggga caggagaaga gaggaataa 1582

cagagagaat gagagcgaca cagacgttag gcatttcctg ctgaacgttt ccccgaagag 1642

tcagccccga ctccctgact ctacactgta ctattgcaga cctgtcacc tgcaggactt 1702

gccaccccc gttccatga tacagtatc aaaaagtatt atcattgctc ccctgataga 1762

agattgttgg tgaattttca aggccctcag ttattttcca ctattttcaa agaaaataga 1822

ttaggtttgc gggggtctga gtctatgttc aaagactgtg aacagcttgc tgtcacttct 1882



tcacctcttc cactccttct ctcactgtgt tactgctttg caaagacccg ggagctggcg 1942  
 gggaaccctg ggagtagcta gtttgctttt tgcgtacaca gagaaggcta tgtaaacaaa 2002  
 ccacagcagg atcgaagggt ttttagagaa tgtgtttcaa aaccatgcct ggtattttca 2062  
 accataaaaag aagtttcagt tgtccttaaa ttgtataac ggtttaattc tgtcttggtc 2122  
 attttgagta tttttaaaaa atatgtcgta gaattccttc gaaaggcctt cagacacatg 2182  
 ctatgttctg tcttcccaaa cccagtctcc tctccatttt agcccagtgt tttctttgag 2242  
 gaccccttaa tcttgctttc tttagaattt ttaccaatt ggattggaat gcagaggtct 2302  
 ccaaactgat taaatatttg aagaga 2328

<210> 14

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Cys | Thr | Asn | Gly | Phe | Asp | Leu | Asp | Arg | Gln | Ser | Gly | Gln | Cys | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Ile | Asp | Glu | Cys | Arg | Thr | Ile | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Gly | Asp | Met |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |
| Met | Cys | Val | Asn | Gln | Asn | Gly | Gly | Tyr | Leu | Cys | Ile | Pro | Arg | Thr | Asn |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Pro | Val | Tyr | Arg | Gly | Pro | Tyr | Ser | Asn | Pro | Tyr | Ser | Thr | Pro | Tyr | Ser |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |
| Gly | Pro | Tyr | Pro | Ala | Ala | Ala | Pro | Pro | Leu | Ser | Ala | Pro | Asn | Tyr | Pro |
|     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     | 80  |



Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu  
85 90 95  
Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln  
100 105 110  
Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys  
115 120 125  
Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile  
130 135 140  
Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro  
145 150 155 160  
Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp  
165 170 175  
Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys  
180 185 190  
Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp  
195 200 205  
Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp  
210 215 220  
Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln  
225 230 235 240  
Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp  
245 250 255  
Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His  
260 265 270  
Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys  
275 280 285



Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp  
290 295 300  
Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro  
305 310 315 320  
Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val  
325 330 335  
Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala  
340 345 350  
Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr  
355 360 365  
Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro  
370 375 380  
Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val  
385 390 395 400  
Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile  
405 410 415  
Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
420

<210> 15

<211> 1269

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15



cagtgcacga atggctttga cctggatcgc cagtcaggac agtgttttaga tatigatgaa 60  
tgccgaacca tccccgaggc ctgccgagga gacatgatgt gtgttaacca aaatggcggg 120  
tatttatgca tccccggac aaacctgtg tatcgagggc cctactcgaa cccctactcg 180  
acccctact caggctcgta cccagcagct gccccaccac tctcagctcc aaactatccc 240  
acgatctcca ggctctttat atgccgcttt ggataccaga tggatgaaag caaccaatgt 300  
gtggatgtgg acgagtgtgc aacagattcc caccagtgc accccacca gatctgcata 360  
aatactgaag gcgggtacac ctgctccgtc accgacggat attggcttct ggaaggccag 420  
tgcttagaca ttgatgaatg tgcctatggt tactgccage agctctgtgc gaatgttcc 480  
ggatcctatt ctgttacaatg caacctgggt ttaccctca atgaggatgg aaggtcttgc 540  
caagatgtga acgagtgtgc caccgagaac cctgcgtgc aaacctgcgt caacacctac 600  
ggctctttca tctgccgtg tgaccagga tatgaacttg aggaagatgg cgttcattgc 660  
agtgatatgg acgagtgcag ctctctgag ttctctgcc aacatgagtg tgtgaaccag 720  
cccgccacat acttctgcic ctgccctcca ggctacatcc tgctggatga caaccgaagc 780  
tgccaagaca tcaacgaatg tgagcacagg aaccacacgt gcaacctgca gcagacgtgc 840  
tacaatttac aagggggcct caaatgcata gacccatcc gctgtgagga gccttatctg 900  
aggatcagtg ataaccgtg tatgtgtcct gctgagaacc ctggctgcag agaccagccc 960  
tttaccatct tgtaccggga catggacgtg gtgtcaggac gctccgttcc cgtgacata 1020  
ttccaaatgc aagccacgac ccgtacctt ggggcctatt acattttcca gatcaaatct 1080  
gggaatgagg gcagagaatt ttacatgcgg caaacgggcc ccatcagtc caccctgggt 1140  
atgacacgcc ccatcaaagg gccccgggaa atccagctgg acttggaaat gatcactgtc 1200  
aacactgtca tcaacttcag aggcagctcc gtgatccgac tgcggatata tgtgtcgcag 1260  
taccattc 1269

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 35



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

cgattgaatt ctagacctgc ctgagnnnn nnnnn

35

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mA55-R1 Primer

<400> 17

cgtttgtgca ctgctgctgt gcattcc

27



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02284

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST File (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.),<br>16 October, 1997 (16. 10. 97),<br>Claims 1 to 9, 11, 12, 14, 17 ; Fig. 1 ;<br>pages 5, 26, 27 & AU, 9655492, A | 1-13                  |
| X         | WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.),<br>23 October, 1997 (23. 10. 97),<br>Claims 17, 18 ; pages 34, 35, 47 to 51, 66 to 73, 82,<br>83 & AU, 9724563, A   | 1-13                  |
| X         | WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.),<br>23 October, 1997 (23. 10. 97),<br>Claims 17, 18 ; pages 34, 35, 47 to 51, 66 to 73, 82,<br>83 & AU, 9728016, A    | 1-13                  |
| P, X      | WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sciences, Inc.),<br>22 October, 1998 (22. 10. 98),<br>Claims 1 to 11 ; pages 13 to 16, 25, 26, 37 to 41<br>& AU, 9727271, A        | 1-13                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
1 June, 1999 (01. 06. 99)Date of mailing of the international search report  
15 June, 1999 (15. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10,  
C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10,  
C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG),  
JICSTファイル (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X               | WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)<br>16. 10月. 1997 (16. 10. 97)<br>請求項1~9, 11, 12, 14, 17, 第1図,<br>第5, 26, 27頁<br>&AU, 9655492, A | 1-13             |
| X               | WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)<br>23. 10月. 1997 (23. 10. 97)<br>請求項17, 18, 第34, 35, 47~51, 66~73,<br>82, 83頁<br>&AU, 9724563, A  | 1-13             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 06. 99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X                     | WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)<br>23. 10月. 1997 (23. 10. 97)<br>請求項17, 18, 第34, 35, 47~51, 66~73,<br>82, 83頁<br>&AU, 9728016, A | 1-13             |
| P, X                  | WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)<br>22. 10月. 1998 (22. 10. 98)<br>請求項1~11, 13~16, 第25, 26, 37~41頁<br>&AU, 9727271, A           | 1-13             |

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]



|  |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 ONF-2970PCT  | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/<br>IPEA/416)を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 99/02284   | 国際出願日<br>(日.月.年) 28.04.99                             | 優先日<br>(日.月.年) 28.04.98 |
| 国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02,<br>A61K38/17, G01N33/68 |   |                         |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>小野薬品工業株式会社   |   |                         |

|  |
|--|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。  |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。<br><br><input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。<br>(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)<br>この附属書類は、全部で _____ ページである。  |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。<br><br>I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎<br>II <input type="checkbox"/> 優先権<br>III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成<br>IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如<br>V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明<br>VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献<br>VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備<br>VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

|   |   |          |
|---|---|----------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>13.10.99                                      | 国際予備審査報告を作成した日<br>11.07.00                                    |          |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br><br>加藤 浩<br><br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4 B 9050 |



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

|                |       |      |   |
|----------------|-------|------|---|
| 新規性 (N)        | 請求の範囲 |      | 有 |
|                | 請求の範囲 | 1-13 | 無 |
| 進歩性 (IS)       | 請求の範囲 |      | 有 |
|                | 請求の範囲 | 1-13 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-13 | 有 |
|                | 請求の範囲 |      | 無 |

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

## 請求の範囲1-2

- 文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)  
文献2: WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)  
文献3: WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献1~3には、本願発明のポリペプチド(特に、文献1の第1図、文献2の第82頁~第83頁、文献3の第82頁~第83頁)が記載されている。

## 請求の範囲3-8

- 文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)  
文献2: WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)  
文献3: WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献1~3には、本願発明のポリペプチドをコードするDNAからなる発現ベクターで形質転換された宿主を用いてポリペプチドを製造することが記載されている。

## 請求の範囲9

- 文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)  
文献1には、本願発明のポリペプチドに対する抗体が記載されている。

## 請求の範囲10-13

- 文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)

文献1には、本願発明のポリペプチド又は抗体を医薬として用いることが記載されていると共に、該ポリペプチドを用いてアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングすることが記載されている。

10

10

10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02284

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST File (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.),<br>16 October, 1997 (16. 10. 97),<br>Claims 1 to 9, 11, 12, 14, 17 ; Fig. 1 ;<br>pages 5, 26, 27 & AU, 9655492, A | 1-13                  |
| X         | WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.),<br>23 October, 1997 (23. 10. 97),<br>Claims 17, 18 ; pages 34, 35, 47 to 51, 66 to 73, 82,<br>83 & AU, 9724563, A   | 1-13                  |
| X         | WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.),<br>23 October, 1997 (23. 10. 97),<br>Claims 17, 18 ; pages 34, 35, 47 to 51, 66 to 73, 82,<br>83 & AU, 9728016, A    | 1-13                  |
| P, X      | WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sciences, Inc.),<br>22 October, 1998 (22. 10. 98),<br>Claims 1 to 11 ; pages 13 to 16, 25, 26, 37 to 41<br>& AU, 9727271, A        | 1-13                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
1 June, 1999 (01. 06. 99)

Date of mailing of the international search report  
15 June, 1999 (15. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## P/ NT COOPERATION TREAT

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

|   |   |
|---|---|
| <b>Date of mailing (day/month/year)</b><br>08 November 1999 (08.11.99)        | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>ONF-2970PCT       |
| <b>International application No.</b><br>PCT/JP99/02284                        | <b>Priority date (day/month/year)</b><br>28 April 1998 (28.04.98) |
| <b>International filing date (day/month/year)</b><br>28 April 1999 (28.04.99) |   |
| <b>Applicant</b><br>HONJO, Tasuku et al                                       |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 October 1999 (13.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |  |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br><br>Maria Kirchner<br><br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 25 AUG 2000

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 ONF-2970PCT   | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/<br>IPEA/416）を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 99/02284  | 国際出願日<br>(日.月.年) 28.04.99                             | 優先日<br>(日.月.年) 28.04.98 |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02,<br>A61K38/17, G01N33/68 |   |                         |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>小野薬品工業株式会社  |   |                         |

|  |
|--|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。  |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。<br><br><input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。<br>(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)<br>この附属書類は、全部で _____ ページである。  |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。<br><br>I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎<br>II <input type="checkbox"/> 優先権<br>III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成<br>IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如<br>V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明<br>VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献<br>VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備<br>VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

|   |   |
|---|---|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>13.10.99                                      | 国際予備審査報告を作成した日<br>11.07.00  |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>加藤 浩<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448<br>4 B 9050 |



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。
- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
4. 補正により、下記の書類が削除された。
- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図
5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

進歩性(I S)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-2

文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)

文献2: WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献3: WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献1~3には、本願発明のポリペプチド(特に、文献1の第1図、文献2の第82頁~第83頁、文献3の第82頁~第83頁)が記載されている。

請求の範囲3-8

文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)

文献2: WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献3: WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)  
23. 10月. 1997 (23. 10. 97)

文献1~3には、本願発明のポリペプチドをコードするDNAからなる発現ベクターで形質転換された宿主を用いてポリペプチドを製造することが記載されている。

請求の範囲9

文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)

文献1には、本願発明のポリペプチドに対する抗体が記載されている。

請求の範囲10-13

文献1: WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)  
16. 10月. 1997 (16. 10. 97)

文献1には、本願発明のポリペプチド又は抗体を医薬として用いることが記載されていると共に、該ポリペプチドを用いてアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングすることが記載されている。



EP



PCT

特 許 協 力 条 約

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

|                                    |                           |   |  |
|------------------------------------|---------------------------|---|--|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号                  | ONF-<br>2970PCT           | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 |  |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 99/02284         | 国際出願日<br>(日.月.年) 28.04.99 | 優先日<br>(日.月.年) 28.04.98                             |  |
| 出願人(氏名又は名称)<br>小 野 薬 品 工 業 株 式 会 社 |                           |   |  |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10,  
C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N15/63, C12N5/10,  
C12N1/21, C12P21/02, A61K38/17, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG),  
JICSTファイル (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X               | WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)<br>16. 10月. 1997 (16. 10. 97)<br>請求項1~9, 11, 12, 14, 17, 第1図,<br>第5, 26, 27頁<br>&AU, 9655492, A | 1-13             |
| X               | WO, 97/39122, A2 (Muro Pharmaceutical, Inc.)<br>23. 10月. 1997 (23. 10. 97)<br>請求項17, 18, 第34, 35, 47~51, 66~73,<br>82, 83頁<br>&AU, 9724563, A  | 1-13             |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 06. 99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇



4 B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



| C (続き). 関連すると認められる文献 |  |                  |
|----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X                    | WO, 97/39123, A2 (Genetics Institute, Inc.)<br>23. 10月. 1997 (23. 10. 97)<br>請求項17, 18, 第34, 35, 47~51, 66~73,<br>82, 83頁<br>&AU, 9728016, A | 1-13             |
| P, X                 | WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sciences, Inc.)<br>22. 10月. 1998 (22. 10. 98)<br>請求項1~11, 13~16, 第25, 26, 37~41頁<br>&AU, 9727271, A           | 1-13             |



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

|   |   |
|---|---|
| <b>Date of mailing (day/month/year)</b><br>08 November 1999 (08.11.99)        |   |
| <b>International application No.</b><br>PCT/JP99/02284                        | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>ONF-2970PCT       |
| <b>International filing date (day/month/year)</b><br>28 April 1999 (28.04.99) | <b>Priority date (day/month/year)</b><br>28 April 1998 (28.04.98) |
| <b>Applicant</b><br>HONJO, Tasuku et al                                       |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 October 1999 (13.10.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |   |
|--|---|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | <b>Authorized officer</b><br>Maria Kirchner<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

